

Aus der **Klinik für Innere Medizin – Schwerpunkt Nephrologie**

Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Hoyer

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Genetische Suppression endothelialer $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ unterdrückt die EDHF-vermittelte Vasodilatation und erzeugt Hypertonie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Sebastian Paul Brähler aus Fulda

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

27. Mai 2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof, Dr, Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. Ralf Köhler

1. Korreferent: Prof. Dr. Dominik Oliver

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen:	5
Zusammenfassung	7
1 Einleitung	9
1.1 Das Endothel	9
1.2 Endothelvermittelte Vasodilatation:	9
1.3 Stickstoffmonoxid (NO)	10
1.4 Prostazyklin	11
1.5 EDHF	12
1.6 Membranpotenzial und Ionenkanäle des Endothels	17
1.6.1 Endotheliale Ionenkanäle und Ruhemembranpotenzial	17
1.6.2 Kaliumkanäle	18
1.7 Ca²⁺-aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca})	19
1.7.1 Der K _{Ca} 1.1-Kanal.....	20
1.7.2 Der K _{Ca} 3.1-Kanal.....	21
1.7.3 Der K _{Ca} 2.3-Kanal.....	26
1.8 Zielsetzung	31
2 Materialien und Methoden	33
2.1 Chemikalien und Geräte	33
2.1.1 Chemikalien	33
2.1.2 Lösungen.....	34
2.1.3 Geräte.....	35
2.1 Tierhaltung, Tierzucht, Genotypisierung	36
2.2.1 Tierhaltung und Tierzucht.....	36
2.1.2 Genotypisierung der transgenen Mäuse.....	37
2.2 Experimente	38
2.3.1 Versuchsvorbereitung/ Präparation der Tiere	38
2.3.2 Versuche am Druckmyographen	39
2.3.3 Patch-Clamp Untersuchungen	43
2.3.4 Membranpotenzialmessungen in situ an glatten Gefäßmuskelzellen	47
2.3.5 Blutdruckmessung.....	47
2.4 Statistische Analysen	48
3 Ergebnisse	49
3.1 Generierung der Versuchstiere	49
3.1.1 Tierzucht	49
3.1.2 Genotypisierung.....	49
3.2 Phänotypisierung der Versuchstiere	52
3.3 Elektrophysiologische Charakterisierung mit der Patch-Clamp- und der Sharp-electrode-Technik	52
3.3.1 Patch-Clamp-Untersuchungen im Whole-Cell-Modus	52
3.3.2 Membranpotenzialmessung mit der Sharp-Electrode-Technik	56
3.4 Untersuchung der Funktion von K_{Ca}2.3 und K_{Ca}3.1 bei der endothelvermittelten Vasodilatation	58
3.4.1 Vasodilatation durch Azetylcholin.....	58

3.4.2	Flussinduzierte Vasodilatation	62
3.5	Blutdruckmessung	65
4	<i>Diskussion</i>	68
4.1	Generierung der Versuchstiere	68
4.2	Behandlung mit Doxyzyklin und Proteinnachweis mittels Western-Blot.....	69
4.3	Verlust von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ führt zur signifikanten Reduktion der endothelialen Hyperpolarisation	70
4.4	Endotheliale $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ haben entscheidenden Einfluss auf das Membranpotenzial der Gefäßmuskelzellen.....	71
4.5	Funktion von $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ bei der Vasodilatation durch EDHF.....	72
4.6	Der Verlust von K_{Ca} -Kanälen führt zu erhöhtem systemischen Blutdruck	76
4.7	EDHF-abhängige Vasodilatation beim Menschen	77
4.8	endotheliale Dysfunktion und therapeutische Perspektiven.....	78
5	<i>Literaturverzeichnis</i>	81
6	<i>Verzeichnis der akademischen Lehrer</i>	92
7	<i>Danksagung:</i>	94

ABKÜRZUNGEN:

A.c.c.	Arteria carotis communis
ACh	Azetylcholin
[Ca²⁺]_i	intrazelluläre freie Ca ²⁺ Konzentration
CAEC	carotide artery endothelial cell (Endothelzelle der A. carotis communis)
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
C- Terminus	Carboxy-Terminus
Cyp₄₅₀	Cytochrom- <i>P</i> ₄₅₀ Epoxygenase
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
Dox	Doxozyklin
EC₅₀	Konzentration mit 50% des maximalen Effekts
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
EETs	epoxyeicosatrienoic acids
EGTA	Ethylene glycol-bis (aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Indo	Indomethazin
IP₃	1, 4, 5-inositol-trisphosphat
K_{Ca}	Ca ²⁺ -aktivierter K ⁺ channel
K_{Ca}2.3^{+/+}	K _{Ca} 2.3-Wildtyp
K_{Ca}2.3^{T/T}	Doxozyklinsensitives K _{Ca} 2.3-Gen
K_{Ca}3.1^{-/-}	K _{Ca} 3.1- Knockout
K_{Ca}3.1^{+/+}	K _{Ca} 3.1 Wildtyp
K_{IR}	inwardly rectifying K ⁺ -Kanal
L-NNA	N ^G -nitro-L-arginine
MAP	mean arterial blood pressure

MOPS	3-[N-morpholino] propane sulfonic acid
NO	Nitric oxide
N-Terminus	Amino-Terminus
PCR	Polymerase chain reaction
PGI₂	Prostazyklin
SNP	Sodium nitroprusside
SOC	storage operated-channel
TAQ-Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
TRAM-34	1-[(2-chlorophenyl) diphenylmethyl]-1 <i>H</i> .pyrazole
UCL1684	6,10-diaza-1,5(1,4)-diquinolina-3(1,3),8(1,4)-dibenzena- cyclodecaphanedium tritrifluoroacetate hydrate
VDCC	voltage-dependent Ca ²⁺ channel
V_m	Membranpotenzial

ZUSAMMENFASSUNG

Das Endothel nimmt Einfluss auf den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und ist somit wichtig für die adäquate Regulation der Gewebeperfusion und des systemischen Blutdrucks. Zur endothelvermittelten Vasodilatation tragen die diffusiblen Moleküle Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI_2) sowie der sogenannte EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) bei. Obwohl dieser EDHF insbesondere in kleineren Arterien und Arteriolen eine wesentliche Rolle zu spielen scheint, konnte die molekulare Identität bzw. die physiologischen Mechanismen dieses Faktors noch nicht abschließend geklärt werden. Mittlerweile werden sowohl eine Reihe diffusibler Moleküle als auch elektrophysiologische Prozesse als Ursache für das EDHF-Phänomen diskutiert. Eine der Hypothesen schreibt der Hyperpolarisation durch die endothelialen Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ eine wesentliche Rolle bei der EDHF-vermittelten Vasodilatation zu.

Zur Klärung der Funktion von $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ im Endothel sollte in dieser Arbeit erstmals ein Mausmodell generiert und untersucht werden, bei dem die Expression beider Ionenkanäle durch genetische Veränderungen beeinflusst wurde. Hierzu sollten zwei bestehende Mausmodelle, die $\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{-/-}$ - Maus und die $\text{K}_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ - Maus, miteinander gekreuzt werden. Während es sich bei der $\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{-/-}$ - Maus um einen konventionellen Knockout handelte, ließ sich bei dem $\text{K}_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ - Gen die Kanalexpression durch orale Gabe der Antibiotikums Doxyzyklin (Dox) unterdrücken. Ohne die Gabe von Doxyzyklin wurde der Kanal durch das veränderte Gen stark überexprimiert.

Die Gene wurden gemäß der Mendelschen Regeln vererbt und der Genotyp der Tiere wurde durch Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt. $\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{-/-}/\text{K}_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ -Tiere zeigten sowohl mit als auch ohne orale Gabe von Doxyzyklin gegenüber Wildtyptieren keine offensichtlichen Auffälligkeiten in Verhalten und Gesundheitszustand. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der Endothelzellen dieser Tiere wurden durch die Patch-Clamp-Technik untersucht. Hierbei zeigte sich jeweils eine Halbierung des K_{Ca} -Stromes bei $\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{-/-}$ - Tieren und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ - Tieren (+Dox) gegenüber Wildtyptieren und eine nahezu vollständige Unterdrückung des K_{Ca} -Stromes bei $\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{-/-}/\text{K}_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ - Tieren (+Dox).

Die Sharp-Electrode-Untersuchung des Membranpotenzials der glatten Gefäßmuskulatur ergab, dass der Verlust der K_{Ca} -Kanäle im Endothel zu einer signifikanten Reduktion der Hyperpolarisation der Gefäßmuskelzellen auf einen

intravasalen Azetylcholinstimulus führte, wobei der Verlust von $K_{Ca3.1}$ einen stärkeren Effekt hatte als der Verlust von $K_{Ca2.3}$. Somit konnte die funktionelle Bedeutung der endothelialen K_{Ca} -Kanäle für die Azetylcholin-induzierte Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur und eine funktionelle Interaktion zwischen Endothelzelle und glatter Gefäßmuskulatur bei der EDHF-mediierten Vasodilatation bestätigt werden.

Die Vasodilatation der Gefäße wurde durch Myographenexperimente an der Arteria carotis communis der Versuchstiere bestimmt. Der Knockout beider K_{Ca} -Kanäle führte zu einer signifikanten Reduktion der Vasodilatation auf intravasale Stimulation mit Azetylcholin. $K_{Ca3.1}$ schien die dominierende Rolle bei der Azetylcholin-induzierten EDHF-vermittelten Vasodilatation einzunehmen. Außerdem war die fluss- und shear-stress-induzierte Vasodilatation ebenfalls signifikant reduziert, wobei der Vergleich der $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ - Mäuse (+ Dox) mit $K_{Ca2.3}^{T/T}$ - Mäusen (+ Dox) für eine dominierende Rolle von $K_{Ca2.3}$ bei der fluss- und shear-stress-induzierten Vasodilatation sprach.

Neben den beschriebenen gravierenden funktionellen Veränderungen auf der zellulären und vaskulären Ebene führten die genetischen Veränderungen auch zu einer signifikanten Erhöhung des arteriellen Blutdruckes der $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ - Mäuse (+Dox) gegenüber den Wildtypmäusen, was die Bedeutung von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ und der von ihnen initiierten EDHF-vermittelten Vasodilatation für die systemische Blutdruckregulation zeigt.

Insgesamt konnte durch die vorliegenden Ergebnisse dieser Studie bestätigt werden, dass die beiden untersuchten K_{Ca} -Kanäle bei der Entstehung der EDHF-Antwort eine wichtige Rolle spielen. Offensichtlich tragen $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ über unterschiedliche Mechanismen und Stimuli zur Vasodilatation bei: $K_{Ca2.3}$ scheint die wichtigere Rolle bei der flussinduzierten Vasodilatation zu spielen, während $K_{Ca3.1}$ vor allem für die Azetylcholin-induzierten Vasodilatation verantwortlich zu sein scheint. Die Bedeutung des EDHF als wesentlicher Faktor der Kreislaufregulation konnte durch die Blutdruckuntersuchungen und die Myographenexperimente bestätigt werden.

Das bessere Verständnis der physiologischen Funktion des Endothels und des vaskulären Systems liefert den Schlüssel zum Verständnis pathophysiologischer Prozesse und eröffnet neue therapeutische Perspektiven. So ist es vorstellbar, dass spezifische Ionenkanalöffner für $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ zukünftig als Antihypertensiva und Vasodilatoren eingesetzt werden.

1 EINLEITUNG

1.1 DAS ENDOTHEL

Das Endothel ist eine einschichtige Lage von Zellen, die die Innenseite aller Blutgefäße auskleidet. Das Endothel ist jedoch mehr als die bloße Barriere zwischen dem Blut und den tieferen Schichten der Gefäße: Es ist an einer beachtlichen Vielfalt von physiologischen Funktionen beteiligt und ist auch ein Ort, an dem sich zahlreiche pathophysiologische Prozesse abspielen. Zu diesen wichtigen Funktionen gehören der selektive Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe, immunologische und inflammatorische Prozesse, die Regulation der Blutgerinnung und die Angiogenese.

Eine weitere wichtige Funktion des Endothels ist sein Einfluss auf den Kontraktionszustand der glatten Gefäßmuskulatur und damit auf den Widerstand im Gefäßsystem. Bei dieser myoendothelialen Interaktion spielen sowohl diffusible Faktoren, die in den Endothelzellen gebildet werden, als auch elektrophysiologische Mechanismen eine Rolle. Durch diese nimmt das Endothel Einfluss auf die Homöostase in unserem Kreislaufsystem, in dem es zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks und der effektiven Blutversorgung der Gewebe beiträgt.

Die Schlüsselfunktion, die das Endothel für die Funktion des vaskulären Systems innehat, wird durch seine Bedeutung bei der Pathogenese von zahlreichen Erkrankungen deutlich. Auf vielfältige Art und Weise kann es zu Schädigungen des Endothels kommen, die zu schweren Funktionseinschränkungen dieses sensiblen Systems führen. Auf diese Weise trägt eine endotheliale Dysfunktion zur Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit, der zerebrovaskulären Arteriosklerose, Nierenschäden und Hypertonie bei.

Das bessere Verständnis der verschiedenen Funktionen des Endothels liefert den Schlüssel zum Verständnis pathophysiologischer Prozesse und ermöglicht somit die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

1.2 ENDOTHELVERMITTELTE VASODILATATION:

Der Kontraktionszustand der Blutgefäße ist ein entscheidender Faktor im kardiovaskulären System. Einerseits wird damit die Perfusion der nachgeschalteten Gewebe reguliert, andererseits ist der Gefäßtonus für den totalen peripheren Widerstand

(TPR) im menschlichen Kreislauf verantwortlich. Dieser periphere Widerstand und das Herzzeitvolumen stellen die beiden entscheidenden Regelgrößen des systemischen Blutdrucks dar. Das Endothel ist in der Lage, durch die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO, endothelium-derived relaxing factor) und Prostazyklin (PGI_2) eine Vasodilatation zu erzeugen und damit den peripheren Widerstand zu beeinflussen. Der dritte wesentliche endotheliale vasodilatierende Faktor ist der sogenannte EDHF (endothelial derived hyperpolarizing factor), der eine Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt. Die genauen molekularen und zellbiologischen Prozesse, die hinter diesem Faktor stehen, sind bis heute noch nicht abschließend aufgeklärt. Die bisherigen Forschungsergebnisse legen jedoch nahe, dass es sich hierbei weniger um einen einzigen diffusiblen Faktor handelt, wie der Name vermuten lässt, sondern um ein System von verschiedenen elektrophysiologischen und chemischen Prozessen (Busse, Edwards et al. 2002; Feletou, Vanhoutte 2006).

1.3 STICKSTOFFMONOXID (NO)

Die Tatsache, dass das Endothel einen vasodilatierenden Effekt auf die Gefäßmuskulatur hat, wurde erstmals von Robert Furchgott 1980 postuliert. Es konnte zum ersten Mal die Existenz eines kurzlebigen Faktors nachgewiesen werden, der nach Stimulation mit Azetylcholin vom Endothel gebildet wird und zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt und deshalb als EDRF (endothelium-derived relaxing factor) bezeichnet wurde (Furchgott, Zawadzki 1980). Dieser Faktor wurde später als das Gas Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Ignarro, Byrns et al. 1987).

Durch das Enzym NO-Synthase (NOS) wird Stickstoffmonoxid aus der Aminosäure L-Arginin gebildet. Als Produkte dieser Reaktion entstehen NO und L-Citrullin. Durch L-Arginin-Analoga (z.B. L-N^G -Mono-methyl-arginin, L-MMA) kann die Synthese und damit die Freisetzung von NO in der Endothelzelle kompetitiv gehemmt werden. Diese Hemmung der NO-Synthese bewirkt eine Reduktion der endothelvermittelten Vasodilatation und damit die Steigerung des Gefäßtonus und des systemischen Blutdrucks (Moncada, Palmer et al. 1989; Rees, Palmer et al. 1990; Moncada, Palmer et al. 1991). Die Aktivität der endothelialen NOS (eNOS) wird dabei vor allem durch die Konzentration des freien intrazellulären Ca^{2+} $[\text{Ca}_i]$ kontrolliert, wobei das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin die Rolle des Ca^{2+} -Sensors übernimmt (Bredt, Snyder 1990).

Die relaxierende Wirkung an der glatten Gefäßmuskulatur kommt über die Bindung von NO an die lösliche Guanylatzyklase zustande. Das so aktivierte Enzym katalysiert die Synthese des second-messengers cGMP aus dem Trinukleotid GTP. Der folgende Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration in der glatten Gefäßmuskelzelle führt zu einer komplexen Signaltransduktionskaskade, in deren Zentrum die Aktivierung der cGMP-sensitiven Proteinkinase steht. Deren Aktivität führt durch ein Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der damit einhergehende Abnahme der Aktivität der Myosinleichtkettenkinase zu einer Relaxation der kontraktilen Filamente Aktin und Myosin (Rapoport, Draznin et al. 1983; Carvajal, Germain et al. 2000).

Neben der cGMP-abhängigen Signaltransduktion interagiert NO auch cGMP-unabhängig mit Kaliumkanälen der glatten Gefäßmuskelzelle wie K_{ATP} , BK_{Ca} , K_{IR} und K_{V} und beeinflusst so direkt das Membranpotential des Myozyten (Feletou, Vanhoutte 2006). Aktuelle Studienergebnisse zeigen, dass die durch NO erzeugte flussinduzierte Vasodilatation effektiver gehemmt wird, wenn die oben genannten NOS-Inhibitoren mit Inhibitoren von K^{+} -Kanälen (Tetraethylammonium, TEA) oder der Cytochrom-P450-Oxydase (Fluconazol) kombiniert werden, was ein funktionelles Zusammenspiel von NO und EDHF-assoziierten Prozessen nahe legt (Bellien, Iacob et al. 2006).

1.4 PROSTAZYKLIN

Neben NO ist Prostazyklin der zweite Faktor, der zu einer endothelvermittelten Vasodilatation der Gefäßmuskulatur führt. Die Entstehung von Prostazyklin in der Endothelzelle wird durch das Enzym Zyklooxygenase katalysiert. Substrat für die Prostazyklinsynthese ist die vierfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure, die durch die Ca^{2+} -aktivierte Phospholipase A_2 aus membranständigen Phospholipiden freigesetzt werden kann (Moncada, Vane 1978; Moncada, Vane 1981). Die Enzym Zyklooxygenase (COX) ist membranständig: die Isoform COX-1 erfüllt physiologische Funktionen im intakten Gewebe, während die COX-2 im Rahmen der Entzündungsreaktion aktiviert wird und daraufhin Entzündungsmediatoren synthetisiert (Smith 1992).

Nach seiner Synthese aktiviert Prostazyklin letztendlich die Adenylatzyklase in der glatten Gefäßmuskulatur. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP. cAMP aktiviert wiederum cAMP-abhängige Proteinkinasen, deren Aktivität zu einer Relaxation des kontraktilen Apparates führt. Durch Hemmung der Zyklooxygenase kann mit Hilfe von nichtsteroidalen Antirheumatika wie z.B. Indomethazin die Synthese

von Prostazyklin blockiert werden (Moncada 1978; Murray 1990). Diese Inhibition der prostazyklinvermittelten Vasodilatation scheint jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf den systemischen Blutdruck zu haben (Richard, Tanner et al. 1990).

Auch Prostazyklin ist durch seine Wirkung an verschiedenen Ionenkanälen wie K_{ATP} , BK_{Ca} , K_{IR} und K_V in der Lage, eine Hyperpolarisation an Endothelzellen zu erzeugen. Allerdings lässt sich auch in Anwesenheit von COX-Hemmern eine beträchtliche endothelvermittelte Hyperpolarisation verzeichnen, was dafür spricht, dass Prostazyklin nur zu einem geringeren Teil für eine endothelvermittelte Hyperpolarisation bzw. EDHF-vermittelte Vasodilatation verantwortlich ist (Feletou, Vanhoutte 2006).

1.5 EDHF

Die Entdeckung, dass das Endothel selbst die Signalmoleküle NO oder Prostazyklin produziert, um den Gefäßtonus zu regulieren, stellt einen Meilenstein im Verständnis der vaskulären Funktion dar. Neben diesen beiden Faktoren konnte in diversen tierischen als auch menschlichen Gefäßen nachgewiesen werden, dass die endotheliale Vasodilatation häufig mit einer Hyperpolarisation der darunter liegenden glatten Gefäßmuskelschicht einhergeht. Dieses Phänomen wurde außerdem durch Inhibitoren der Cyclooxygenase (COX) und der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) nicht oder nur in geringem Maße beeinflusst. Dies führte dazu, dass zur vollständigen Erklärung der endothelabhängigen Vasodilatation ein dritter, bis lang unbekannter endothelialer Faktor postuliert wurde, der aufgrund seiner hyperpolarisierenden Eigenschaft EDHF (endothelial derived hyperpolarizing factor) genannt wurde (Chen, Suzuki et al. 1988; Feletou, Vanhoutte 1988; Feletou, Vanhoutte 2006).

Die Bedeutung, die der EDHF-Signalweg für die endothelvermittelte Vasodilatation hat, ist von der Größe der Gefäße abhängig: Während z.B. in der Aorta die Bedeutung des EDHF eher vernachlässigbar ist, scheint er in Arterien unter 500 μm Durchmesser für mindestens die Hälfte und in Widerstandsgefäßen (Arteriolen $< 100 \mu\text{m}$) für den überwiegenden Teil der endothelabhängigen Vasodilatation verantwortlich zu sein (Shimokawa, Yasutake et al. 1996).

Trotz der intensiven Arbeit zahlreicher Forschungsgruppen auf diesem Gebiet konnte bislang die Identität des EDHF und die damit verbundenen Signaltransduktionsmechanismen noch nicht ausreichend geklärt werden. Der Hauptgrund dafür ist wahrscheinlich, dass es sich hierbei nicht wie bei NO oder PGI_2

um einen einzelnen chemischen Faktor handelt, sondern dass verschiedene Transmittersubstanzen und Signaltransduktionssysteme unabhängig voneinander oder gemeinsam zur Hyperpolarisation und Vasodilatation der Gefäßmuskulatur beitragen (Busse, Edwards et al. 2002; Feletou, Vanhoutte 2006). Die unterschiedlichen Konzepte sollen im Folgenden nun genauer erläutert werden.

Trotz aller Kontroversen über die genauen Mechanismen, die die EDHF-Antwort bilden, besteht ein Konsens darüber, dass initial die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei der Einleitung der EDHF-Antwort eine wesentliche Rolle spielt (Nilius, Droogmans 2001). Verschiedene Agonisten an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wie z.B. Acetylcholin oder Pharmaka, die Ca^{2+} aus intrazellulären -Speicher freisetzen (z.B. Thapsigargin), führen zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und nachfolgend zu einer Hyperpolarisation der Endothelzelle (Johns, Freay et al. 1988; Chen, Cheung 1992; Fukao, Hattori et al. 1995).

Mittlerweile besteht Einigkeit darüber, dass eine endotheliale Hyperpolarisation notwendig ist, um die Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzelle (siehe **Abb. 1.1**) einzuleiten. Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt zu einer Aktivierung von Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen (K_{Ca}), wodurch ein K^+ -Ausstrom entlang des Konzentrationsgradienten aus der Zelle erfolgt. Dieser Ausstrom von Kationen aus dem Zellinneren führt zu einer Hyperpolarisation der Endothelzelle, d.h. das Zellinnere wird gegenüber dem Extrazellulärraum elektrisch negativer. Hierbei spielen wahrscheinlich die Kanäle $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ eine zentrale Rolle (Köhler, Hoyer 2007), deren Funktion auch in dieser Arbeit untersucht werden soll.

Experimentell konnte die EDHF-Antwort durch Kombination der Inhibitoren von $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ (TRAM 34, Charybdotoxin) und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ (Apamin, Tubocurarin, UCL 1684) gehemmt werden, wodurch die zentrale Bedeutung dieser Ionenkanäle deutlich wird. Ein weiterer Ca^{2+} -aktivierter Kaliumkanal, der in Blutgefäßen vorkommt, ist der $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ -Kanal. Im Gegensatz zu Charybdotoxin (Blocker von $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$) kann Iberiotoxin (spezifischer Blocker für $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$) keine deutliche Reduktion der EDHF-Antwort bewirken, was gegen eine zentrale Rolle von $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ bei der EDHF-Antwort spricht (Köhler, Brakemeier et al. 2001; Busse, Edwards et al. 2002; Bychkov, Burnham et al. 2002; Eichler, Wibawa et al. 2003; Feletou, Vanhoutte 2006).

Die Hyperpolarisation der Gefäßmuskelzellen ist ein sehr effektiver Weg eine Relaxation zu erzeugen. Der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel ist die wichtigste Größe zur Regulation des Kontraktionszustandes von Muskelzellen. Dieser Spiegel wird durch die

Hyperpolarisation über eine Reduktion der Öffnungswahrscheinlichkeit von spannungssensitiven Ca^{2+} -Kanäle (L-Typ-Kanäle) reduziert, was dann zur Relaxation der kontraktilen Filamente führt. Gleichzeitig wird durch eine Hemmung des IP_3 -Signalweg die Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum gehemmt (Itoh, Seki et al. 1992; del Valle-Rodriguez, Lopez-Barneo et al. 2003). Es gibt verschiedene Erklärungsansätze, wie die Hyperpolarisation der Endothelzellen anschließend zu einer Hyperpolarisation der darunterliegenden glatten Gefäßmuskelzelle führt:

Eine Möglichkeit ist, dass die endotheliale Hyperpolarisation durch eine direkte elektrotonische Kopplung über myoendotheliale Gap-Junctions auf die glatte Gefäßmuskulatur überspringt. Dies könnte dann zur Abnahme der Öffnungswahrscheinlichkeit von spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanälen führen. Die damit verbundene Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der glatten Gefäßmuskelzelle führt dann zu einer Relaxation der Gefäßmuskulatur. Solche myoendothelialen Gap Junctions sind in einer Vielzahl von Gefäßen unterschiedlicher Spezies nachgewiesen worden (Griffith 2004).

Gap Junctions bilden direkte elektrische Verbindungen zwischen Zellen, in denen zwei Connexone, die wiederum aus jeweils sechs Connexin-Proteinen bestehen, einen zentralen Kanal bilden. In Blutgefäßen wurden vor allem die Connexine 37, 40 und 43 nachgewiesen, von denen Connexin 37 und 40 vor allem in endothelialen Zellen und Connexin 43 bevorzugt in glatten Gefäßmuskelzellen vorkommt (Yeh, Rothery et al. 1998). Die funktionelle Bedeutung von Gap Junctions für die EDHF-vermittelte Vasodilatation wurde durch Experimente bestätigt, bei denen durch pharmakologische Inhibition der Gap Junctions oder genetischen Knockout von Connexinproteinen die EDHF-Antwort zum Teil oder ganz blockiert werden konnte. Mäuse, die durch einen genetischen Knockout kein Connexin 40 bilden konnten, zeigten außerdem Bluthochdruck und eine abnorme Vasodilatation, was für eine tragende Rolle elektrischer Kopplungsmechanismen bei der Gefäßregulation spricht (Taylor, Chaytor et al. 1998; de Wit, Roos et al. 2000; de Wit, Roos et al. 2003; Griffith 2004). Weiterhin scheint die elektrotonische Kopplung von Endothelzellen und glatter Gefäßmuskelzellen, ähnlich wie die EDHF-vermittelte Vasodilatation, insbesondere in Widerstandsgefäßen wie Arteriolen und kleinen Arterien eine Rolle zu spielen, was ebenfalls für einen Zusammenhang zwischen myoendothelialer Kopplung und EDHF-Weiterleitung spricht (Shimokawa, Yasutake et al. 1996; Sandow, Hill 2000).

Eine zweite Möglichkeit der Signalübertragung zwischen Endothel und glatter Gefäßmuskulatur ist die direkte Wirkung von K^+ -Ionen an der glatten Gefäßmuskulatur. K^+ -Ionen strömen durch die Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ in den interzellulären Raum zwischen Endothel und glatter Muskulatur ein (Edwards, Dora et al. 1998). Ein Anstieg der Kaliumkonzentration in diesem Kompartiment kann zu einer Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase und von K_{IR} -Kanälen (einwärtsrektifizierende K^+ -Kanäle) in der Zellmembran der glatten Gefäßmuskelzellen führen. Bei diesen leicht erhöhten und nicht-spasmogenen Kaliumkonzentrationen kommt es also zu einer Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle (Nelson, Quayle 1995; Prior, Webster et al. 1998). Die Bedeutung, die diese Form der myoendothelialen Kommunikation bei der EDHF-vermittelten Vasodilatation hat, ist trotz dieser Ergebnisse noch unklar und wird kontrovers diskutiert, da K^+ -induzierte Hyperpolarisationen und Relaxationen in einigen Blutgefäßen nicht nachgewiesen werden konnten, die eine EDHF-Antwort aufweisen (Edwards, Feletou et al. 1999; Lacy, Pilkington et al. 2000; Feletou, Vanhoutte 2006). **Abbildung 1.1** veranschaulicht den hypothetischen EDHF-Signalweg.

Das Endothel bildet neben NO und PGI_2 auch andere diffusible Moleküle, die eine Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur induzieren und somit als Teil des EDHF-Systems in Betracht kommen. Hierbei richtet sich besondere Aufmerksamkeit auf Metabolite der Arachidonsäure, die durch Cytochrom-P450-Epoxygenasen entstehen (Feletou, Vanhoutte 2006). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese sogenannten EETs (epoxyeicosatrienoic acids) in verschiedenen Gefäßen als EDHF wirken. Scherkräfte, die durch den Blutfluss auf das Endothel wirken sowie Agonisten wie z.B. Bradykinin führen zur Synthese und Freisetzung der EETs, die durch Wirkung an $K_{Ca1.1}$ -Kanälen zu einer Hyperpolarisation und Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führen. Interessanterweise nimmt, ähnlich wie beim EDHF, die Bedeutung der EETs für die Hyperpolarisation mit sinkendem Gefäßdurchmesser zu (Campbell, Gebremedhin et al. 1996; Fisslthaler, Popp et al. 1999; Huang, Sun et al. 2005; Fleming, Busse 2006).

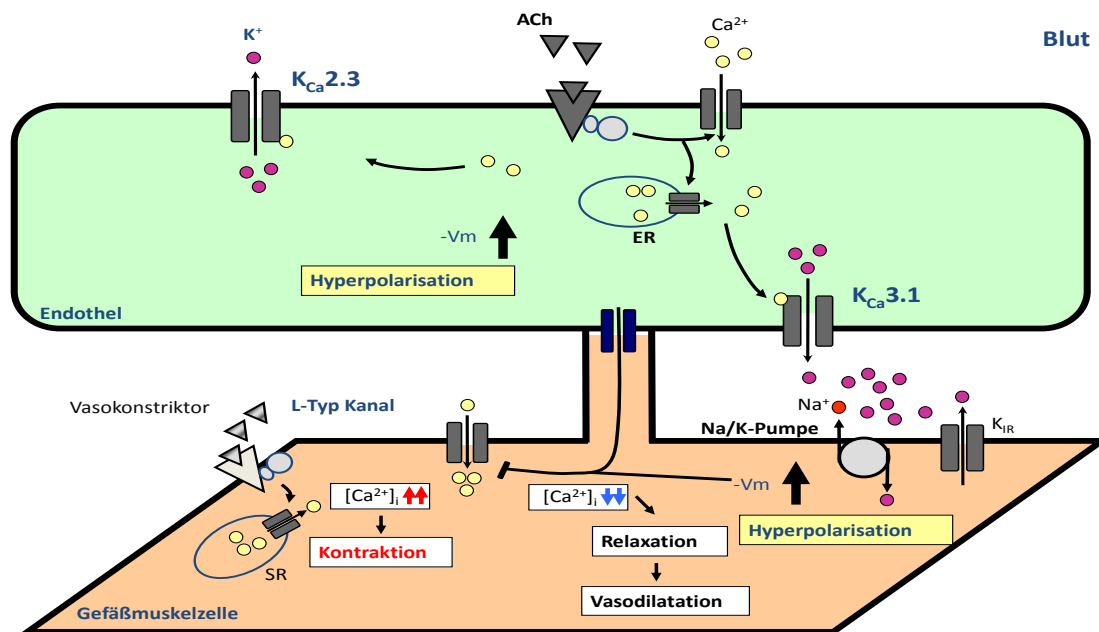


Abbildung 1.1: schematische Darstellung des hypothetischen EDHF-Signalweges:

Vasoaktive Substanzen wie z.B. Azetylcholin (ACh) binden an endotheliale Rezeptoren. Diese führen G-Protein-gekoppelt zum Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert die Kanäle $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$. Durch den folgenden K^+ -Ausstrom kommt es zur Hyperpolarisation der Endothelzelle. Diese Hyperpolarisation wird über elektrotonische Kopplung via Gap Junctions an die glatte Gefäßmuskulzelle weitergeleitet und führt hier über den Schluss von spannungssensitiven L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen zur Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und letztendlich zur Relaxation der kontraktile Filamente Aktin und Myosin. Eine weitere Möglichkeit der Signalübertragung besteht in der direkten Wirkung der ausgeströmten K^+ -Ionen an der Na^+/K^+ -Pumpe und an K_{IR} -Kanälen, die anschließend die glatte Gefäßmuskulzelle hyperpolarisieren, was wiederum über den Schluss von L-Typ-Kanälen zur Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt (Abbildung modifiziert nach Grgic, Kaistha et al. 2009).

Diese Hyperpolarisation und Relaxation der Gefäßmuskulatur durch EETs konnte experimentell durch Hemmstoffe der Cytochrom-P450-Epoxygenase, wie z.B. Miconazol gehemmt werden (Campbell, Gebremedhin et al. 1996). In ähnlicher Weise war auch der EETs-Antagonist 14,15-epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid (14,15-EEZE) in der Lage, die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur zu reduzieren (Gauthier, Deeter et al. 2002). Campbell et. al. konnten weiterhin zeigen, dass eine direkte intravaskuläre Applikation von EETs eine Gefäßrelaxation auslösen kann. Hohe extrazelluläre K^+ -Konzentrationen und K^+ -Kanalinhhibitoren wie Iberitoxin konnten diese Relaxation ebenfalls inhibieren (Campbell, Gebremedhin et al. 1996).

Zusätzlich zur gut belegten Wirkung als diffusibler Kanalöffner an $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ zeigen verschiedene Studien, dass EETs außerdem Einfluss auf die Aktivität von $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$

und $K_{Ca3.1}$ und damit auf die Hyperpolarisation der Endothelzelle haben könnten. So ist es möglich, dass EETS über die Wirkung an TRPV4-Kanälen (eine Gruppe von endothelialen Ca^{2+} -Kanälen) Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nehmen und dadurch den Aktivitätszustand von Ca^{2+} -aktivierten Ionenkanälen modulieren können oder über cAMP und Proteinkinase A auf diese Kanäle wirken (Fleming, Busse 2006).

Die vielfältigen Erklärungsansätze zu Identität und Mechanismus der EDHF-abhängigen Antwort legen nahe, dass es sich hierbei nicht um einen einzelnen Signalweg, sondern um ein System von verschiedenen Signalwegen handelt, an deren Anfang die endotheliale Hyperpolarisation steht. Eine wechselseitige Interaktion zwischen diesen Systemen ist ebenfalls vorstellbar.

1.6 MEMBRANPOTENZIAL UND IONENKANÄLE DES ENDOTHEL

1.6.1 ENDOTHELIALE IONENKANÄLE UND RUHEMEMBRANPOTENZIAL

Ionenkanäle sind Membranproteine, die den Ionenfluss zwischen Zytoplasma und Extrazellulärraum durch eine Kanalpore ermöglichen. Das Endothel exprimiert eine große Vielfalt von Ionenkanälen, wobei sich Endothelzellen aus verschiedenen Gefäßtypen oder unterschiedlichen Kulturmedien in ihrer Ausstattung mit Ionenkanälen stark unterscheiden können. Das Ruhemembranpotenzial der Endothelzelle ist verglichen mit dem Blut und dem umgebenden Gewebe negativ und wird mit stark variablen Werten von 0 bis -80 mV bei einem Membranwiderstand von 1-10 G Ω angegeben (Nilius, Droogmans 2001).

Für die Kontrolle des Membranpotenzials sind vor allem Kaliumkanäle, aber auch Chloridkanäle und nicht selektive Kanäle (NSCs = nonselective-channels) verantwortlich. Eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials spielen einwärtsrektifizierende K^+ -Kanäle (K_{IR}), die eine Basalaktivität aufweisen und das Membranpotenzial dem negativen Kaliumgleichgewichtspotenzial annähern. Neben den K_{IR} -Kanälen bestimmen auch VRACs (= volume-regulated-anion-channels), die vor allem für Cl^- permeabel sind, und die Hintergrundaktivität der NSCs das Ruhemembranpotenzial der Endothelzelle (Fransen, Demolder et al. 1995; Voets, Droogmans et al. 1996; Nilius, Droogmans 2001).

Auf die meisten Stimuli reagiert die Endothelzelle initial mit einer Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die in den vielen Fällen durch einen Ca^{2+} -Einstrom erhöht wird. Dies ist wiederum abhängig vom elektrochemischen Ca^{2+} -Gradienten, der wesentlich vom Membranpotenzial beeinflusst wird (Nilius, Droogmans 2001). Agonisten wie Azetylcholin, ATP oder Bradykinin führen in Endothelzellen zu einem biphasischen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die erste Phase zeigt eine kurze Ca^{2+} -Konzentrationsspitze, die durch Freisetzung von Ca^{2+} als IP_3 -sensitiven intrazellulären Speichern erfolgt. Es folgt eine längere plateauartige zweite Phase, die durch den Ca^{2+} -Einstrom durch Ionenkanäle gebildet wird. Als Einstromkanäle kommen sogenannte SOCs (storage-operated-channels), die durch Entleerung von Ca^{2+} -Speichern aktiviert werden, und TRP-Kanäle (transient-receptor-potential-channels) in Frage (Schilling, Cabello et al. 1992; Vaca and Kunze 1995; Dolor, Hurwitz et al. 1992; Nilius, Droogmans 2001; Pedersen, Owsianik et al. 2005).

Die Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist einer der wichtigsten intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen und von besonderer Bedeutung bei der Aufklärung der Rolle von Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanälen bei der EDHF-Antwort.

1.6.2 KALIUMKANÄLE

Kaliumkanäle stellen eine große Familie mit über 300 unterschiedlichen Kanälen dar (Hille, Armstrong et al. 1999). Sie weisen eine hohe Leitfähigkeit auf und sind dabei höchst selektiv für Kaliumionen, während sie für andere Anionen wie z.B. Ca^{2+} und Na^+ kaum permeabel sind. Diese hohe Selektivität entsteht vor allem durch den Selektivitätsfilter, der ein Teil der zentralen Kanalpore ist. An diesem Selektivitätsfilter befindet sich ebenfalls eine spezielle Aminosäuresequenz, das TTVGYG-Motiv, welches typisch für die Kaliumkanäle ist (Doyle, Cabral et al. 1998; Roux 2005). Kaliumkanäle bestehen aus verschiedenen Untereinheiten von Transmembranproteinen. Während die zentrale Pore ein gemeinsames Merkmal aller Kaliumkanäle darstellt, unterscheiden sie sich in der Zusammensetzung durch ihre verschiedenen Untereinheiten, die Lage der transmembranalen Domänen und die Lage von N- und C-Terminus. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal sind die verschiedenen Mechanismen, die zur Aktivierung und Inaktivierung der Kaliumkanäle führen (Yellen 2002). Kaliumionen strömen durch die geöffnete Kanalpore entlang des Konzentrationsgradienten aus dem Intrazellulärraum in den Extrazellulärraum. Dies

verschiebt das Membranpotenzial zu negativeren Werten, es kommt zu Hyperpolarisation.

1.7 Ca^{2+} -AKTIVIERTE KALIUMKANÄLE (K_{Ca})

Bei den Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle unterscheidet man fünf verschiedene Untergruppen, die gemäß der neuen Nomenklatur von 2003 als $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$, $\text{K}_{\text{Ca}}2.1$, $\text{K}_{\text{Ca}}2.2$, $\text{K}_{\text{Ca}}2.3$ und $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ bezeichnet werden (Gutman, Chandy et al. 2003). K_{Ca} -Kanäle wurden zuerst in Erythrozyten beschrieben, wo ihre Aktivität zu einer Zellschrumpfung und Membranhyperpolarisation führt (Gardos 1958).

Diese K_{Ca} -Kanäle bilden aus jeweils vier Untereinheiten den tetrameren K^+ -leitenden Kanalkomplex. Gemeinsam ist diesen Ionenkanälen die Aktivierung durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, wobei $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ und $\text{K}_{\text{Ca}}2.3$ Calmodulin als Ca^{2+} -Sensor verwenden, während $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ in seiner Proteinstruktur eine eigene Ca^{2+} -Bindungsstelle aufweist (Ledoux, Werner et al. 2006).

Wichtige Merkmale zur Unterscheidung dieser Kanäle sind die fehlende Spannungsabhängigkeit von $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ und $\text{K}_{\text{Ca}}2.3$ im Gegensatz zu BK sowie unterschiedliche Leitfähigkeiten. Die K_{Ca} -Kanäle kommen in einer Vielzahl von Organen und Geweben vor, darunter einige Vertreter auch im kardiovaskulären System, Nervensystem und einigen endokrinen Geweben (Vergara, Latorre et al. 1998; Ledoux, Werner et al. 2006).

Die K_{Ca} -Kanäle werden ebenfalls in Blutgefäßen exprimiert. In den Endothelzellen konnten vor allem $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ und $\text{K}_{\text{Ca}}2.3$ nachgewiesen werden, während diese Kanäle in den glatten Gefäßmuskelnzellen der Media nicht oder nur in geringem Maße existieren. Im Gegensatz dazu kommt der $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ -Kanal nach bisherigen Forschungsergebnissen vornehmlich in Myozyten, in Endothelzellen von Schweinen und in geringerem Ausmaß in humanen, jedoch nicht in murinen Endothelzellen vor (Neylon, Lang et al. 1999; Köhler, Degenhardt et al. 2000; Köhler, Brakemeier et al. 2001; Burnham, Bychkov 2002; Bychkov, Burnham et al. 2002).

1.7.1 DER $K_{Ca1.1}$ -KANAL

Der $K_{Ca1.1}$ -Kanal wurde wegen seiner hohen Leitfähigkeit von 200-300 pS früher auch als Maxi-K oder BK (für big conductance) bezeichnet (Atkinson, Robertson et al. 1991; Adelman, Shen et al. 1992). Der native BK-Kanal besteht aus vier porenbildenden α -Untereinheiten, die mit vier regulatorischen β -Untereinheiten assoziiert sind. Es sind zahlreiche Spleißvarianten für die α -Untereinheiten bekannt. Jede Untereinheit besteht aus 7 Transmembrandomänen (S_0 - S_6). Die weiteren Domänen S_7 bis S_{10} befinden sich im zytoplasmatischen C-Terminus, der eine entscheidende Rolle bei der Ca^{2+} -Sensitivität und der Modulation des Kanals spielt. Ca^{2+} bindet hier an eine c-terminale Domäne, die auch als Ca^{2+} -Bowl bezeichnet wird, siehe **Abb. 1.2** (Knaus, Eberhart et al. 1994; Schreiber and Salkoff 1997; Tanaka, Meera et al. 1997; Ledoux, Werner et al. 2006).

Bei der β -Untereinheit handelt es sich um ein Protein mit zwei Transmembrandomänen (TMD). An jede α -Untereinheit kann sich eine β -Untereinheit anlagern, was das Aktivierungsverhalten beeinflusst und die Ca^{2+} -Sensitivität des Kanals erheblich steigert (Tseng-Crank, Godinot et al. 1996; Brenner, Perez et al. 2000; Ledoux, Werner et al. 2006).

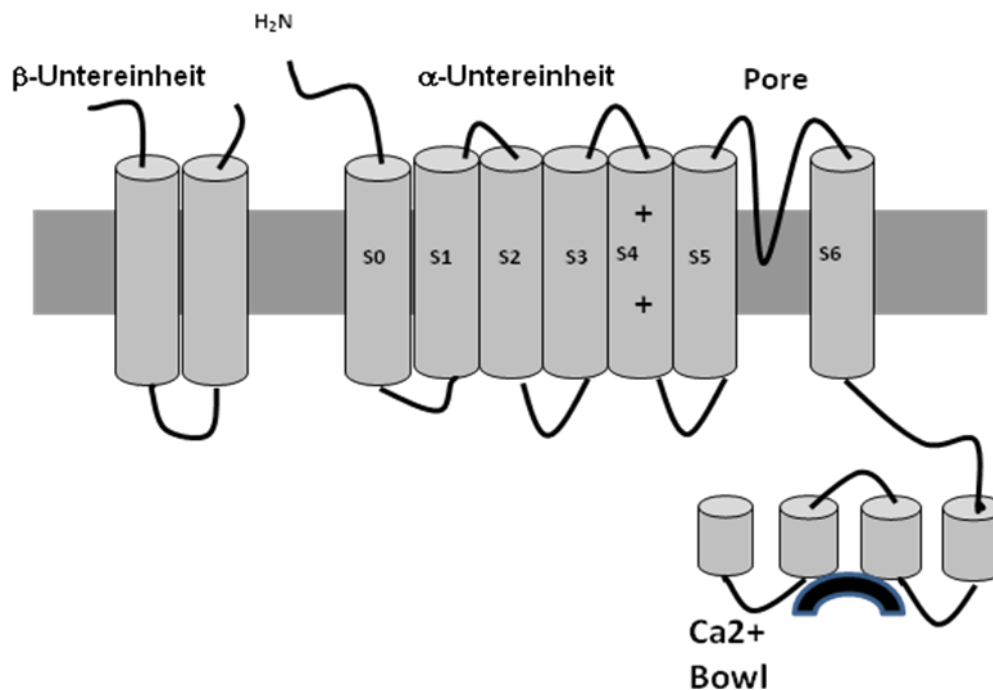


Abbildung 1.2: Darstellung einer einzelnen α -Untereinheit eines $K_{Ca1.1}$ -Kanals mit sieben Transmembrandomänen (0-6) und einer angelagerten β -Untereinheit mit zwei Transmembrandomänen. Der sehr lange intrazelluläre C-Terminus beinhaltet den sogenannten Ca^{2+} -Bowl, der für die Ca^{2+} -Sensitivität des Ionenkanals verantwortlich ist (Abb. modifiziert nach Grgic, Kaistha et al. 2009).

Die Öffnungswahrscheinlichkeit von $K_{Ca1.1}$ wird zusätzlich über das Membranpotenzial reguliert, d.h. der Kanal weist eine Spannungsabhängigkeit auf. Hierbei repräsentiert die Domäne S_4 , die einige positive Aminosäuren beinhaltet, den Spannungssensor des Kanals. Speziell bei niedrigen intrazellulären Ca^{2+} -Spiegeln verhält sich der Kanal wie ein rein spannungsabhängiger Kanal. Ca^{2+} verschiebt die Parameter der spannungsabhängigen Aktivierung zu negativeren Potenzialen, so dass der Kanal auch bei physiologischen Membranpotenzialen arbeiten kann (Barrett, Magleby et al. 1982; Cox, Cui et al. 1997; Horrigan, Cui et al. 1999; Talukder, Aldrich 2000; Ledoux, Werner et al. 2006).

Die Aktivität von $K_{Ca1.1}$ kann außer durch das Membranpotenzial und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration noch durch einige andere Signalwege wie z.B. second-messenger (cAMP, cGMP) oder durch Kanalphosphorylierung moduliert werden (Ledoux, Werner et al. 2006). Für die pharmakologische Untersuchung des Kanals stehen Öffner wie NS-1619 und Blocker wie Charybdotoxin und Iberiotoxin zur Verfügung. Bei den Blockern ist zu beachten, dass Iberiotoxin selektiv für $K_{Ca1.1}$ ist, während Charybdotoxin außerdem noch auf den $K_{Ca3.1}$ -Kanal wirkt. (Galvez, Gimenez-Gallego et al. 1990; Olesen, Munch et al. 1994; Gribkoff, Starrett et al. 1997; Schubert, Nelson 2001; Ledoux, Werner et al. 2006).

1.7.2 DER $K_{Ca3.1}$ -KANAL

Der $K_{Ca3.1}$ -Kanal und die drei Kanäle der $K_{Ca2.x}$ -Familie weisen, was Funktion, Aktivierung und Struktur betrifft, einige gemeinsame Eigenschaften auf. Die Unterschiede bestehen vor allem in der Leitfähigkeit und im Verteilungsmuster der Kanäle auf die unterschiedlichen Gewebe.

Der $K_{Ca3.1}$ - Kanal, vor der Einführung der aktuellen Nomenklatur aufgrund seiner Leitfähigkeit auch als IK (intermediate conductance) oder SK4 (small conductance 4) bezeichnet, wurde erstmals 1958 in Erythrozyten beschrieben, wo er zur Regulation des Zellvolumens und des Membranpotenzials beiträgt (Gardos 1958). Die Klonierung des Ionenkanals erfolgte 1997 (Ishii, Silvia et al. 1997; Logsdon, Kang et al. 1997). Das $K_{Ca3.1}$ -Gen ist beim Menschen auf Chromosom 19q13.2 und bei der Maus auf Chromosom 7A3 lokalisiert und besteht aus neun Exons. Der Kanal weist eine 50%ige Homologie zu den Kanälen der $K_{Ca2.3}$ -Genfamilie auf (Ishii, Silvia et al. 1997; Joiner, Wang et al. 1997).

K_{Ca} 3.1 wird durch eine geringe Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration aktiviert. Die EC₅₀, also die Ca²⁺-Konzentration, bei der die Hälfte der Kanäle geöffnet ist, liegt bei ca. 200-300 nM. Der Kanal zeigt eine Leitfähigkeit von ca. 35 pS (Ishii, Silvia et al. 1997; Logsdon, Kang et al. 1997).

Neben der bereits angesprochenen Lokalisation im Gefäßendothel kommt der Kanal in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe verschiedener Spezies vor: Dazu zählen unter anderem T-Lymphozyten (Wulff, Miller et al. 2000), Fibroblasten (Pena and Rane 1999), Erythrozyten (Gardos 1958) und Leberzellen (Joiner, Wang et al. 1997) sowie Placenta- und Lungengewebe (Logsdon, Kang et al. 1997).

Die Strukturen der Kanäle aus der K_{Ca}2.x- Familie und die des K_{Ca}3.1-Kanals sind ähnlich. Ein funktioneller Kanal besteht aus vier Untereinheiten (**siehe Abb. 1.3**), von denen jede aus sechs Transmembrandomänen besteht, wobei N- und C-Terminus des Proteins intrazellulär liegen. Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich K_{Ca}3.1 und K_{Ca}2.x von K_{Ca}1.1 durch das Fehlen von Spannungssensitivität und die Abwesenheit eines C-terminalen Ca²⁺-bindenden Motivs, wie z.B. der EF-Hand oder des Ca²⁺-Bowls (Ledoux, Werner et al. 2006). Fanger et. al. konnten nachweisen, dass stattdessen das Ca²⁺-bindende Protein Calmodulin (CaM), dessen Rolle bei der intrazellulären Ca²⁺-Signalgebung bereits bekannt ist, an den C-Terminus jeder Untereinheit bindet und so als ein sehr empfindlicher Ca²⁺-Sensor wirkt. Jeweils ein CaM-Protein bindet unabhängig von der Anwesenheit von Ca²⁺ an den proximalen zytoplasmatischen C-Terminus jeder der vier Untereinheiten. Zwar moduliert CaM auch die Aktivität anderer Ionenkanäle, jedoch ist die Funktion als integraler Bestandteil des Gating-Mechanismus einzigartig und scheint spezifisch für K_{Ca}3.1 und K_{Ca}2.x zu sein (Fanger, Ghanshani et al. 1999).

Auch bei den K_{Ca}2.x- Kanäle konnte diese Funktion von CaM als Ca²⁺-Sensor nachgewiesen werden, was wahrscheinlich auch der Grund für die ähnliche Ca²⁺-Sensitivität und das vergleichbare Gating-Verhalten ist. Vermutlich spielt Calmodulin ebenfalls eine wichtige Rolle beim Zusammenbau der Untereinheiten zu einem funktionsfähigen Kanal und bei der Regulation der Expression der Kanäle an der Zelloberfläche (Xia, Fakler et al. 1998; Fanger, Ghanshani et al. 1999; Joiner, Khanna et al. 2001; Schumacher, Crum et al. 2004).

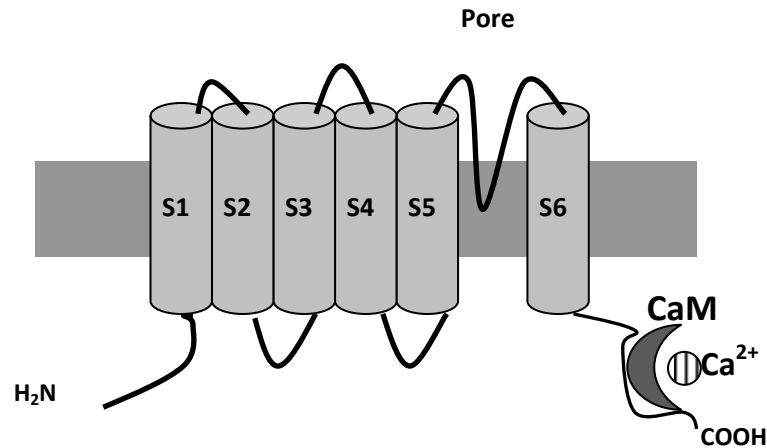


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Untereinheit von K_{Ca}3.1 und K_{Ca}2.x: Die Untereinheit besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1–S6) und einer Kanalpore (P). Jeweils vier dieser Untereinheiten bilden das Homotetramer des vollständigen Ionenkanals. Im Bereich des intrazellulären C-Terminus ist das Ca²⁺-sensitive Protein Calmodulin gebunden, das für die Ca²⁺-Sensitivität des Ionenkanals verantwortlich ist (Abb. modifiziert nach Grgic, Kaistha, et al. 2009).

Der K_{Ca}3.1-Kanal erfüllt weitere physiologisch und pathophysiologisch wichtige Funktionen:

Der K_{Ca}3.1 spielt eine Rolle bei der Regulation immunologischer Prozesse, wie Untersuchungen an T-Zellen zeigen. In aktivierten T-Zellen ist die Expression des Kanals gegenüber den ruhenden Zellen deutlich erhöht. Stimulation der Zellen durch Aktivatoren der Proteinkinase C (Phorbol ester) und der intrazellulären Ca²⁺-Kaskade (Ionomycin) rufen ebenfalls eine Erhöhung der Kanalexpression hervor, was für die Bedeutung dieser beiden Signalwege bei der Immunantwort spricht (Ghanshani, Wulff et al. 2000).

Andere Untersuchungen zeigen eine Beteiligung von K_{Ca}3.1 bei der Kontrolle der Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen, was auch Auswirkungen auf die Angiogenese hat. Die Expression des Kanals wird durch die Wachstumsfaktoren VEGF (vascular endothelial growth factor) und bFGF (fibroblast growth factor), die das Wachstum von Endothelzellen und Fibroblasten stimulieren, erhöht. Die selektive Blockade des Kanals durch das Clotrimazolderivat TRAM-34 kann in vitro die Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen inhibieren. Durch diese Blockade des K_{Ca}3.1 konnte im Mausmodell die Restenose nach Ballonkatheterisierung sowie die Angiogenese gehemmt werden (Köhler, Wulff et al. 2003; Grgic, Eichler et al. 2005).

Die Aktivität des $K_{Ca3.1}$ kann durch eine Reihe von Substanzen pharmakologisch beeinflusst werden. Die Entwicklung von immer spezifischeren Kanalblockern- und -öffnern bietet die Möglichkeit zur Aufklärung der Funktion dieses Kanals auf zellulärer und systemischer Ebene.

Der $K_{Ca3.1}$ wird durch die Benzimidazolinone 1-Ethyl-2-benzimidazolinon (1-EBIO) und dessen potenteres Derivat 5,6-Dichloro-1-ethyl-2-benzimidazolinon (DC-EBIO) aktiviert, indem diese Substanzen die Öffnungszeit nach Kanalaktivierung beträchtlich verlängern (Syme, Gerlach et al. 2000; Singh, Syme et al. 2001).

Durch den Austausch des Imidazolrings von Clotrimazol durch einen Pyrazolring konnte der Inhibitor TRAM34 (EC_{50} : 20 nmol/L) (1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1*H*-pyrazol) entwickelt werden, der eine wesentlich höhere Spezifität und Potenz aufweist und heute die erste Wahl zur pharmakologischen Blockade von $K_{Ca3.1}$ darstellt. TRAM34 weist gegenüber Clotrimazol eine geringere Lebertoxizität auf und eignet sich dadurch auch besser für in-vivo-Experimente (Wulff, Miller et al. 2000). Die Bindungsstelle für TRAM-34 und Clotrimazol liegt intrazellulär unterhalb des Selektivitätsfilters des Ionenkanals und beinhaltet die Aminosäuren Valin und Threonin, die wahrscheinlich entscheidend für die Sensitivität des Kanals für diese Blocker sind (Wulff, Gutman et al. 2001). Zusätzlich zu diesen sogenannten Triarylmethan-Blockern wird der $K_{Ca3.1}$ auch durch das Skorpiongift Charybdotoxin (EC_{50} : 5 nmol/L) inhibiert, welches ebenfalls hemmend auf die Aktivität des $K_{Ca1.1}$ -Kanals wirkt (Ishii, Silvia et al. 1997; Joiner, Wang et al. 1997; Logsdon, Kang et al. 1997).

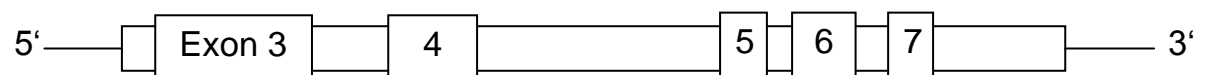
Neben der pharmakologischen Blockade besteht eine effektive Möglichkeit der Ausschaltung der Kanalfunktion in der Ausschaltung des für den Kanal kodierenden Gens (Knockout) und der Untersuchung der daraus folgenden funktionellen Konsequenzen. 2006 konnten Si et al. aus der eigenen Arbeitsgruppe durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen eine $K_{Ca3.1}$ -Knockout-Maus generieren (Si, Heyken et al. 2006). Im Gen für $K_{Ca3.1}$ wurde das Exon 4, welches für die Kanalpore kodiert, durch die Sequenz für eine Neomycin-Resistenz ersetzt, wodurch eine Blockade der Kanalexpression erzielt werden konnte (siehe **Abb 1.4**). Die Veränderung des $K_{Ca3.1}$ -Gens wurde durch RT-PCR an mRNA aus der Milz nachgewiesen. Der Verlust des Proteins konnte durch Western-Blot-Analyse an Erythrozyten nachgewiesen werden, von denen bekannt ist, dass sie den Kanal normalerweise enthalten („Gardos-Kanal“ siehe oben). Homozygote $K_{Ca3.1}$ -

Knockouttiere waren lebensfähig und fertil, und zeugten mit ebenfalls homozygoten Partnern ebenfalls lebensfähigen Nachwuchs (Si, Heyken et al. 2006).

Patch-Clamp-Untersuchungen an frisch isolierten Endothelzellen aus der Aorta dieser Tiere konnten das Fehlen der K_{Ca} -Ströme gegenüber den Kontrollgruppen bestätigen. Darüberhinaus zeigten Messungen des Membranpotenzials eine deutliche Verringerung der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation. Um nachzuweisen, dass diese Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften auf der zellulären Ebene auch Konsequenzen auf die EDHF-vermittelte Vasodilatation hat, wurden Untersuchungen am Druckmyographen an der Arteria carotis communis von transgenen Tieren und Wildtyptieren durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, dass die transgenen Tiere in Anwesenheit von Indomethazin und L-NNA (Blocker der COX bzw. der eNOS) eine signifikante Verringerung der Vasodilatation gegenüber der Kontrollgruppe aufwiesen. In Abwesenheit von L-NNA und Indomethazin zeigten beide Gruppen eine größere Vasodilatation, die $K_{Ca}3.1$ -KO-Gruppe lag aber immer noch signifikant unter der Wildtypgruppe. Im Gegensatz dazu hatte der genetische Knockout weder einen Einfluss auf die α_1 -vermittelte Vasokonstriktion noch auf den basalen Tonus der Gefäße.

Durch diese Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass der genetische Knockout des $K_{Ca}3.1$ -Gens eine effiziente Methode zur Untersuchung der Funktion des $K_{Ca}3.1$ -Kanals ist. Die Vermutung, dass dieser Kanal eine wichtige Rolle bei der EDHF-vermittelten Vasodilatation spielt, konnte bestätigt werden (Si, Heyken et al. 2006).

$K_{Ca}3.1$ - Wildtyp



$K_{Ca}3.1$ - Knockout

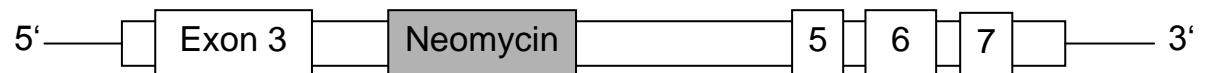


Abbildung 1.4: schematische Darstellung der Genstruktur des $K_{Ca}3.1$ -Wildtypgens und des $K_{Ca}3.1$ -Knockoutgens. Dargestellt sind die Exone 3-7. Im $K_{Ca}3.1$ -Knockoutgen wurde Exon 4 durch das Neomycin-Resistenzgen ersetzt (Abbildung modifiziert nach Si, Heyken et al. 2006).

1.7.3 DER $K_{Ca2.3}$ -KANAL

$K_{Ca2.x}$ -Kanäle zeigen Einzelleitfähigkeiten von 4-14 pS und sind damit die Kalzium-aktivierten Kaliumkanäle mit der niedrigsten Leitfähigkeit (deshalb auch als SK, von „small-conductance“, bezeichnet). Sie sind wie $K_{Ca3.1}$ sehr sensitiv für Ca^{2+} , und werden bereits durch Ca^{2+} -Konzentrationen von 300-700nM halbmaximal aktiviert, wobei sie wie der $K_{Ca3.1}$ keine Spannungsabhängigkeit aufweisen. Sie werden vor allem in Nervengewebe und erregbaren Zellen exprimiert, wo sie vermutlich in engem Zusammenhang mit der sogenannten langsamen Nachhyperpolarisation (sAHP) zu stehen scheinen (siehe unten) (Köhler, Hirschberg et al. 1996; Stocker 2004).

Obwohl die Aktivierung der $K_{Ca2.x}$ -Kanäle spannungsunabhängig ist, zeigen sie einwärtsrektifizierende Eigenschaften. Bei positiverem Membranpotenzialen werden die SK-Ströme zunehmend durch bivalente Kationen wie Mg^{2+} , Ba^{2+} und schließlich auch Ca^{2+} gehemmt, was zu einer nicht-linearen Strom-Spannungs-Beziehung führt (Köhler, Hirschberg et al. 1996; Soh and Park 2001).

Der Aufbau dieser Kanäle ist dem bereits dargestellten Aufbau der $K_{Ca3.1}$ -Kanäle sehr ähnlich. Die Kanäle haben interzelluläre C- und N- Termini und sechs konservierte Transmembrandomänen. Das S4-Segment der $K_{Ca2.x}$ -Kanäle zeigt im Vergleich zu K_V -Kanälen eine geringere Anzahl und veränderte Anordnung von positiv geladenen Aminosäuren (Köhler, Hirschberg et al. 1996; Stocker 2004), was wahrscheinlich, ähnlich wie bei $K_{Ca3.1}$, der Grund für die fehlende Spannungssensitivität dieser Gruppe von Ionenkanälen ist. Ähnlich wie $K_{Ca3.1}$ besitzt $K_{Ca2.3}$ selbst keine Ca^{2+} -bindenden Domänen. Auch hier ist Calmodulin an einer Calmodulin-bindenden Domäne (CaMBD) distal der S6-Domäne an den C-Terminus gebunden und fungiert als sensibler Ca^{2+} -Detektor. Für die Stabilisierung des CaM an der CaMBD sind wohl vor allem hydrophobe Wechselwirkungen verantwortlich. Ergebnisse aus kristallographischen Untersuchungen geben genauere Hinweise zum Gating-Mechanismus der CaM-gekoppelten K_{Ca} -Kanäle: In Anwesenheit von Ca^{2+} kommt es zu einer Dimerisierung der CaM-CaMBD-Komplexe, die zu einer Konformationsänderung führen, die über die benachbarte S6-Domäne an die Kanalpore weitergegeben wird. Dies führt letztlich zur Öffnung der Kanalpore und zur Aktivierung des K^+ -Austroms (Xia, Fakler et al. 1998; Schumacher, Rivard et al. 2001; Schumacher, Crum et al. 2004; Stocker 2004; Ledoux, Werner et al. 2006).

Köhler et al. konnten erstmals 1996 die cDNA der Kanäle aus Gehirngewebe von Menschen und Ratten isolieren. Die Gene konnten geklont und in *Xenopus* Oozyten

exprimiert werden. (Köhler, Hirschberg et al. 1996). Die SK-Kanäle werden durch paraloge Gene kodiert und haben eine komplexe Struktur aus neun Exons bei $K_{Ca2.1}$ und acht Exons bei $K_{Ca2.2}$ und $K_{Ca2.3}$. Das Gen für $K_{Ca2.3}$ konnte durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Chromosom 1q21.3 lokalisiert werden. Die Exon-Intron-Grenzen für alle drei $K_{Ca2.x}$ -Kanäle sind in unterschiedlichen Spezies konserviert (Dror, Shamir et al. 1999; Litt, LaMorticella et al. 1999; Stocker 2004).

Die Transskripte des Gens für $K_{Ca2.1}$ und des Gens für $K_{Ca2.3}$ für SK2.3 Gen zeigen die Möglichkeit des alternativen Spleißens, so dass unterschiedliche Polypeptide das Ergebnis der Genexpression sein können, z.B. konnten im Gehirn der Maus 20 verschiedene Transskripte nachgewiesen werden. Die Bedeutung dieser posttranskriptionellen Modifikation ist allerdings noch unklar, beispielsweise könnten die Kanäle so an ihre Funktion in unterschiedlichen Geweben angepasst werden (Shmukler, Bond et al. 2001; Tomita, Shakkotai et al. 2003).

Bei der EDHF-vermittelten Vasodilatation spielt vor allem $K_{Ca2.3}$ (SK3) zusammen mit dem bereits genannten $K_{Ca3.1}$ (IK) eine wichtige Rolle, indem sie durch ihre Kaliumleitfähigkeit für die initiale Hyperpolarisation der Endothelzelle verantwortlich sind. Demgegenüber werden die anderen Kanäle $K_{Ca2.1}$ und $K_{Ca2.2}$ nur in geringem Maße im Endothel exprimiert. Die $K_{Ca2.3}$ -Kanäle kommen in den Gefäßen vor allem in den Endothelzellen und weniger in der glatten Gefäßmuskulatur vor (Bychkov, Burnham et al. 2002).

Der Kanäle der $K_{Ca2.x}$ -Familie werden darüber hinaus auch vor allem in Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert, wobei die drei verschiedenen Typen in unterschiedlichen Strukturen lokalisiert sind. $K_{Ca2.1}$ und $K_{Ca2.2}$ zeigen ein sehr ähnliches Verteilungsmuster, sie findet man vor allem im Neocortex, Thalamus und in einigen kranialen Motoneuronen. Der $K_{Ca2.3}$ findet sich dagegen vorwiegend in subkortikalen Regionen wie dem lateralen Septum, den medialen Habenulae, in Hirnnervenkernen (Ncl. dorsalis vagi und Ncl. ambiguus) und in einigen Thalamuskernen. Auffällig ist, dass der Kanal in vielen monoaminergen Strukturen zu finden ist, so z.B. in der Substantia nigra (vor allem Dopamin), den dorsalen Raphekernen (Serotonin) und dem Ncl. coeruleus (Noradrenalin) (Stocker, Pedarzani 2000; Tacconi, Carletti et al. 2001; Stocker 2004). Im menschlichen Gehirn wurde die mRNA des Kanals vor allem in der Substantia nigra, den Basalganglien und subthalamischen Nuclei nachgewiesen. Ein weiterer Schwerpunkt der Lokalisation sind die Amygdala und der Hippocampus (Dror, Shamir et al. 1999). Obwohl die genaue

Funktion der Kanäle der $K_{Ca2.x}$ -Familie im zentralen Nervensystem noch nicht abschließend geklärt ist und die verschiedenen Autoren die Rolle dieser Kanäle unterschiedlich bewerten, besteht doch ein Konsens, dass sie für die Regulation der neuronalen Erregbarkeit und Aktivität wichtig sind. Ein Mechanismus, der hier eine Rolle zu spielen scheint, ist die sogenannte langsame Nachhyperpolarisation (sAHP für slow afterhyperpolarization), die auf eine Salve von Aktionspotenzialen folgt und deren Frequenz begrenzt. Eine weitere Möglichkeit besteht in der funktionellen Kopplung zwischen K_{Ca} -Kanalaktivität und der Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (Stocker 2004).

Zur pharmakologischen Untersuchung des $K_{Ca2.3}$ -Kanals können eine Reihe von Inhibitoren und Aktivatoren eingesetzt werden. Neben dem Bienengift Apamin, dem klassischen Blocker von $K_{Ca2.3}$, stehen auch Non-Peptid-Blocker wie das sehr selektive UCL 1684 (6,10-Diaza-3(1,3),8(1,4)-dibenzena-1,5(1,4)-Diquinolinacyclodecaphan) zur Verfügung (Burgess, Claret et al. 1981; Rosa, Galanakis et al. 1998). Wie $K_{Ca3.1}$ kann auch $K_{Ca2.3}$ durch die Benzimidazole 1-EBIO und dessen potenteres Derivat DC-EBIO effektiv aktiviert werden (Syme, Gerlach et al. 2000; Singh, Syme et al. 2001).

Neben der pharmakologischen Untersuchung der $K_{Ca2.x}$ -Familie wurde auch mit gentechnischen Methoden zur Charakterisierung und Aufklärung der Kanalfunktion beigetragen. Im Jahr 2000 stellten Bond und Adelman et al. (Bond, Sprengel et al. 2000) ihre Untersuchungen zu einer transgenen Maus vor, bei denen das Gen für den $K_{Ca2.3}$ modifiziert wurde. Dieses Gen wurde auch zusammen mit dem oben genannten $K_{Ca3.1}$ -Knockout-Gen zur Zucht der $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Maus für diese Doktorarbeit verwendet.

Dieses Gen ist so konstruiert, dass erst durch die Gabe des Antibiotikums Doxzyklin (Dox) über das Trinkwasser der Tiere die Expression des Gens und damit des Kanalproteins gehemmt wird. In Abwesenheit von Doxzyklin wird der Kanal durch einen sehr aktiven Promotor ca. dreifach überexprimiert (siehe **Abb. 1.5**). Durch molekularbiologische Methoden wie Immunohistochemie, Western-Blot und RT-PCR konnte bei homozygoten Mäusen (als $SK3^{T/T}$ -Mäuse bezeichnet) nachgewiesen werden, dass ohne Doxzyklin die Expression des Kanals verglichen mit dem Wildtyp erhöht war und durch Gabe von Doxzyklin der Kanal annähernd vollständig reduziert werden konnte. Die Gabe von Doxzyklin an tragende Weibchen führte zur Blockade der Expression des Kanals bei neugeborenen $SK3^{T/T}$ -Mäusen, die aber sonst keine

Entwicklungsauffälligkeiten zeigten. Bei adoleszenten oder adulten homozygoten Tieren ($SK3^{T/T}$) wurde durch die Doxyzyklin- Gabe ebenfalls kein auffälliger Phänotyp hervorgerufen. Durch die starke Überexpression des Kanals bei $SK3^{T/T}$ -Tieren in Abwesenheit von Doxyzyklin (z.B. dreifach höhere Expression im Gehirn verglichen mit dem Wildtyp) zeigten sich zwei phänotypische Auffälligkeiten: Einerseits zeigten die Tiere bei hypoxischer Belastung ein verändertes Atemmuster, andererseits konnten $K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Weibchen bei der Geburt die Frucht nicht aus dem Geburtskanal austreiben, was wahrscheinlich an der starken Überexpression des $K_{Ca2.3}$ -Kanals im Uterus lag (Bond, Sprengel et al. 2000).

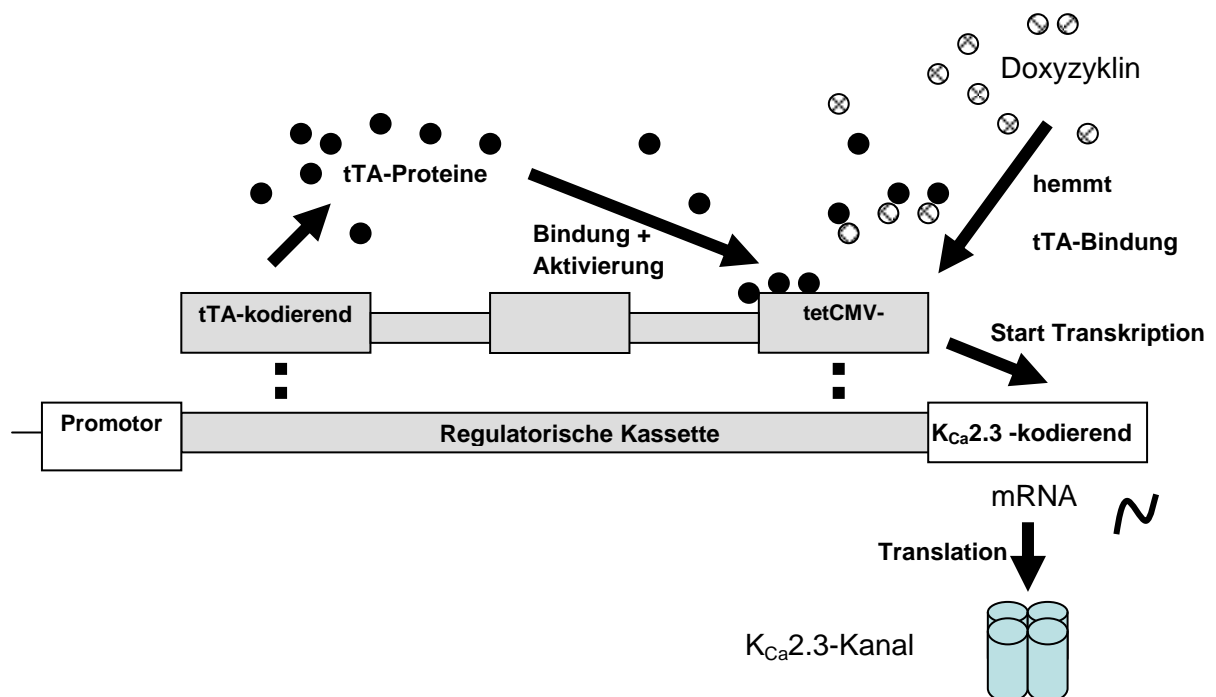


Abbildung 1.5: Struktur und Funktionsweise des Doxyzyklin-sensitiven $K_{Ca2.3}^T$ -Gens: Zwischen nativem Promotor und der kodierenden Sequenz für die $K_{Ca2.3}$ -Untereinheiten wurde eine regulatorische Kasse eingefügt, deren wichtigste Komponenten die kodierende Sequenz des tTA-Proteins (Tetrazyklin-transaktivierendes Protein) und der Tetrazyklin-sensitive CMV-Promotor sind. Das tTA-Protein wird exprimiert, bindet an den tetCMV-Promotor und führt so zur (Über-)Expression des $K_{Ca2.3}$ -Kanals. Wird Doxyzyklin den Tieren über das Trinkwasser gegeben, so bindet Dox an das tTA-Protein und verhindert die Bindung an den Promotor, wodurch die Expression des Ionenkanals unterbunden wird (Abbildung modifiziert nach Bond, Sprengel et al. 2000).

Die kardiovaskuläre Charakterisierung dieser Mäuse (Taylor, Bonev et al. 2003) zeigte eine starke Überexpression des Kanals in Endothelzellen ohne Behandlung mit Dox und eine nahezu vollständige Unterdrückung der Kanalexpression bei Behandlung mit Dox.

Die elektrophysiologische Patch-Clamp-Untersuchung der Endothelzellen, zeigte ebenfalls deutlich erhöhte $K_{Ca2.3}$ -Ströme (Apamin-sensitiv) bei den überexprimierenden Tieren verglichen mit den mit Dox behandelten Knockout-Tieren. Auf der vaskulären Ebene führte die Blockade der $K_{Ca2.3}$ -Expression zu einem erhöhten Gefäßtonus bei Stimulation des Gefäßes durch unterschiedliche intravasale Drücke und den α_1 -Rezeptoragonisten Phenylephrin. Mäuse mit der Überexpression des Kanals zeigten außerdem eine Erhöhung des arteriellen Gefäßdurchmessers. Schließlich wirkte sich die Beeinflussung der Kanalexpression auch auf den Blutdruck aus: Die Unterdrückung der Kanalexpression führte zu einer deutlichen Erhöhung des Blutdrucks, die durch den Entzug von Dox wieder reversibel war. Diese Ergebnisse bestätigten die Hypothese, dass auch der $K_{Ca2.3}$ -Kanal eine wichtige Rolle bei endothelvermittelten Vasodilatation spielt.

1.8 ZIELSETZUNG

Die funktionelle Bedeutung der beiden Ca^{2+} -aktivierten Ionenkanäle $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ bei der endothelvermittelten Vasodilatation und damit bei der Blutdruckregulation ist noch nicht abschließend geklärt. Bisherige Forschungsergebnisse legen nahe, dass die beiden Ionenkanäle eine wichtige Rolle bei der endothelvermittelten Vasodilatation spielen (Feletou, Vanhoutte 2006). Die genetische Manipulation der Kanalexpression ist aussagekräftiger als pharmakologische Modelle, da hier Probleme mit der oft mangelnden Spezifität der eingesetzten Inhibitoren nicht auftreten und auch in- vivo-Untersuchungen besser möglich sind. Ein konventionelles Knockout-Modell für $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ (Si, Heyken et al. 2006) und ein induzierbares Knockoutmodell für $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ (Bond, Sprengel et al. 2000) wurden bereits erfolgreich erstellt und untersucht. Ein Modell, bei dem die Expression beider Ionenkanäle durch genetische Manipulation verändert ist, bestand bislang allerdings nicht und sollte die Möglichkeit bieten, auch funktionelle Unterschiede zwischen den Ionenkanälen zu identifizieren. Die vorliegende Arbeit hatte zunächst das Ziel, ein solches Mausmodell durch Kreuzung von $\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{-/-}$ -Mäusen (Si, Heyken et al. 2006) mit $\text{K}_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ -Mäusen (Bond, Sprengel et al. 2000) zu erzeugen.

Folgende Hypothesen sollten anschließend in Experimenten geklärt werden:

1. Die beiden endothelialen Kaliumkanäle $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ spielen eine wesentliche Rolle bei der endothelialen Hyperpolarisation. Durch die Hemmung der Kanalexpression werden hyperpolarisierende K_{Ca} -Ströme in der Endothelzelle und die nachgeschaltete Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur unterdrückt. Hierzu sollten Messungen mit der Patch-Clamp-Technik an Endothelzellen und mit der Sharp-Electrode-Technik an der glatten Gefäßmuskulatur vorgenommen werden.
2. $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ spielen eine wichtige Rolle bei der EDHF-vermittelten Vasodilatation. In Abwesenheit der Kanäle sollte die Fähigkeit zur Vasodilatation der Gefäße vermindert sein. Diese Hypothese sollte durch Myographenexperimente an der Arteria carotis communis der Versuchstiere untersucht werden. Hierbei sollten verschiedene Stimuli wie z.B. Azetylcholin und die Erhöhung der Wandschubspannung (shear stress) eingesetzt werden. In Untersuchungen an jeweils $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -defizienten bzw. $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ -defizienten Tieren

sollte geprüft werden, ob der jeweilige Kanaltyp spezifische Funktionen für die EDHF-vermittelte Vasodilatationsprozesse hat.

3. Es wird vermutet, dass die EDHF-Signalgebung auch wichtig für die Regulation des systemischen Blutdrucks ist. Die Veränderungen in der Kanalexpression der Versuchstiere sollten also zu Veränderungen des systemischen Blutdrucks führen. Dies sollte durch kontinuierliche telemetrische Blutdruckmessungen überprüft werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN UND GERÄTE

2.1.1 CHEMIKALIEN

- Agarose (Fermentas)
- Azetylcholin (Sigma-Aldrich)
- Desoxynukleotid-Set (Fermentas)
- Dextran (Roche)
- DNA-Sizer 100 bp (Fermentas)
- Doxyzyklin (Sigma-Aldrich)
- Ethidiumbromid (Merck)
- Glucose (Merck)
- HEPES (Sigma-Aldrich)
- Indomethazin (Sigma-Aldrich)
- Isofluran (Baxter)
- MEM-Earle (Biochrom)
- MOPS (Sigma-Aldrich)
- Natriumnitroprussid (Sigma-Aldrich)
- N^G-Nitro-L-Arginin (Sigma-Aldrich)
- Patch-Clamp-Badlösung, Patch-Clamp-Pipettenlösung (Zusammensetzung siehe unten)
- PBS-Puffer (PAA)
- PCR-Primer (Sigma-Prologo)
- Phenylephrin (Tocris)
- PSS-Puffer für Myographenexperimente (Zusammensetzung siehe unten)
- Pyruvat (PAA)
- Sucrose (Sigma-Aldrich)
- Taq-Polymerase (Fermentas)
- TRAM-34 (1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol) (freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Heike Wulff, University of California, Davis, California, USA zur Verfügung gestellt)
- Trypsin (PAA)
- UCL1648 (Tocris)

2.1.2 LÖSUNGEN

2.1.2.1 Experimente am Druckmyographen

	<u>Standardbadlösung (PSS)</u>
NaCl	145,0
NaH ₂ PO ₄	1,2
KCl	4,7
MgSO ₄	1,2
CaCl ₂	2,0
Glucose	5,0
Pyruvat	2,0
MOPS-Puffer	3,0

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Standardbadlösung (PSS). Sofern nicht anders angegeben, verstehen sich alle Angaben als Konzentration in mM. (Substanzen von Sigma - Aldrich).

2.1.2.2 Patch-Clamp Experimente

Substanzen	Pipettenlösung	Badlösung
NaCl	-	137
Na ₂ ATP	1	-
KCl	140	3
MgCl ₂	1	0,4
CaCl ₂ /[Ca ²⁺] _{frei}	1,91/3	0,7
NaH ₂ PO ₄	-	4,5
KH ₂ PO ₄	-	1,5
EGTA	2	-
HEPES	5	-
Glucose	-	10
pH-Wert	7,2	7,4

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der verwendeten Pipettenlösung und Badlösung. Sofern nicht anders angegeben, verstehen sich alle Angaben als Konzentration in mM. Die Berechnung der freien Ca²⁺-Konzentration erfolgte nach Fabiato, Fabiato (1979). (Substanzen von Sigma-Aldrich).

2.1.3 GERÄTE

- Pressure Myograph System P100 (Fa. J.P. Trading I/S, Dänemark)
- Mikrodissektionsbesteck (Fa. Aesculap, Tuttlingen)
- Stereomikroskop (Fa. Zeiss, Jena)
- Mikroskop Axiovert 135 (Fa. Zeiss, Jena)
- Schwingungsisolierter Tisch (Fa. Physik Instrumente, Waldborn)
- Patch-Clamp Mikromanipulator (Eigenbau, Max-Planck-Institut, Frankfurt/Main)
- Computergesteuerter EPC-9 Patch-Clamp-Verstärker (Fa. HEKA Elektronik, Lambrecht)
- Pipettenziehgerät DMZ-Universal-Puller (Fa. Zeitz, Augsburg)
- Borosilikatkapillaren, Länge: 7,5 cm, Innendurchmesser: 0,9 mm, Wandstärke: 0,3 mm (Fa. Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, Großbritannien)
- Experimentierbad: Badkammer für 2 ml Volumen (Wolfgang Hampel, Neu Isenburg)
- Meß- und Referenzelektrode: Chlorierte Silberdrähte (Silber-/Silberchlorid-Elektrode)
- Thermocycler (GeneAMP 2700, Fa. ABI System, USA)
- Netzteil (EV243, Fa. PeqLab, Erlangen) und Elektrophoresebad (Agagel Mini Biometra, Fa. Blomed-Analytik), UV-Tisch
- Telemetrie (TA11PA-C10, Fa. Data Quest International, Portsmouth, Großbritannien)
- Laborwaage (BP310P, Fa. Sartorius, Göttingen)

2.1 TIERHALTUNG, TIERZUCHT, GENOTYPISIERUNG

2.2.1 TIERHALTUNG UND TIERZUCHT

Alle Tiere für diese Studie wurden in der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Universität Marburg gehalten. Es wurden maximal sechs Tiere in einem Standardkäfig gehalten. Die Tiere lebten in einem temperaturkontrollierten Raum ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) bei einem 12h Tag-Nacht-Zyklus und es stand ihnen Standardnagerfutter (0.25% Natrium, SNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser zur freien Verfügung.

Für die Generierung der $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Mäuse wurden homozygote $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Tiere mit homozygoten $K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Tieren verpaart. Die $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Maus wurde in unserer eigenen Arbeitsgruppe generiert (Si, Heyken et al. 2006). Bei diesen Tieren ist Exon 4 des nativen $K_{Ca3.1}$ -Gens durch das 160 bp längere Neomycin-Resistenz-Gen ersetzt worden (siehe **Abb. 1.4**). Dies führt dazu, dass ein Teil der Sequenz, welche für die Pore kodiert, deletiert wurde. Ferner führte dies zu einer Verschiebung im Leseraster (Si, Heyken, et al. 2006).

Die $K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. John P. Adelman vom Vollum Institute, Portland, Oregon, USA zur Verfügung gestellt. Bei diesen Tieren wurde in den nichtkodierenden Teil des Gens am 5'-Ende hinter dem nativen Promotor eine regulatorische Kassetten aus drei funktionellen Modulen eingefügt (Bond, Sprengel et al. 2000) (siehe Abbildung **1.5**). Die tTA-Sequenz kodiert das Tetrazyklin-Transaktivator-Protein und folgt einer Adenovirus-Sequenz, die eine hocheffektive Initiation der Transkription gewährleistet. Danach folgt ein SV40-Poly-Adenylatschwanz, um die Transskription der tTA-Sequenz zu terminieren.

Als zweites folgt das bakterielle Neomycin(G418)-Resistenzgen, das durch den Herpes-Simplex-Virus Thymidin-Kinase-Promotor und das URA3Gen (Hefe) aktiviert wird. Diese Marker werden von loxP-Sequenzen, gefolgt vom Polyadenylatschwanz des Human Growth Hormon Gens (hGH polyA), flankiert. Das letzte Modul besteht aus fünf Kopien des Tet-Operators in Verbindung mit dem Zytomegalievirus-Promotor (tet05 CMV).

Die Aktivität des nativen Promotors des $K_{Ca2.3}$ -Gens führt zur Expression des tTA-Proteins, das wiederum die Expression des Kanalproteins durch Bindung und Aktivierung des tet05CMV-Promotors veranlasst. Das Tetrazyklinantibiotikum

Doxyzyklin bindet an tTA und verhindert die Bindung von tTA an seine Zielsequenz, was die Bildung des $K_{Ca}2.3$ -Kanalproteins verhindert (Bond, Sprengel et al. 2000).

Homozygote $K_{Ca}3.1^{-/-}$ Tiere wurden mit homozygoten $K_{Ca}2.3^{T/T}$ verpaart. Aus dem heterozygoten Nachwuchs wurde wiederum Zuchtpaare gebildet, deren Nachkommen zu ca. 6% den Genotyp $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T}$ hatten. Die Nachkommen wurden spätestens 23 Tage post partum von der Mutter entwöhnt und nach ihrem Geschlecht getrennt. Das Geburtsdatum, das Elternzuchtpaar, Geschlecht, die Generation und der Genotyp wurden auf der Käfigkarte dokumentiert. Nach der Genotypisierung wurden homozygote $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}3.1^{T/T}$, $K_{Ca}3.1^{+/+}/K_{Ca}3.1^{T/T}$ -Tiere, Wildtypiere ($K_{Ca}2.3^{+/+}/K_{Ca}3.1^{+/+}$) sowie $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{+/+}$ -Tiere für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Alle Muttertiere, die homozygot für das $K_{Ca}2.3^T$ - Gen waren, bekamen fünf Tage vor dem geschätzten Geburtstermin bis zur Geburt Doxyzyklin (2mg/ml in 2% Sucroselösung) über das Trinkwasser verabreicht, um die durch die Überexpression des $K_{Ca}2.3$ induzierten Probleme bei der Austreibung der Jungtiere zu vermeiden (siehe Einleitung).

2.1.2 GENOTYPISIERUNG DER TRANSGENEN MÄUSE

Der Genotyp der Mäuse wurde durch jeweils eine separate Polymerasekettenreaktion (PCR) für $K_{Ca}3.1$ und $K_{Ca}2.3$ bestimmt. Für die Bestimmung der Allele des $K_{Ca}3.1$ -Gens wurden folgende Primer (Fa. Sigma-Proligo) verwendet:

Kcnn4: 5' - CTTTGGATCCAGATGTTTCTTGGTGTTAAG - 3'

Exon4rev: 5' - GCCACAGTGTGTCTGTGAGG – 3'

Neorev 5' - CGTGCAATCCATCCATCTTGTTCA – 3'

Hierbei bindet der Kcnn4-forward-Primer an das Intron, das vor dem Exon 4 des Gens liegt, während der Exon4rev-Primer spezifisch für Exon4 ist. Der Neorev-Primer bindet an das in das manipulierte Kanalgen eingefügte Neomycin-Resistenzgen. Die erwarteten Längen der PCR-Produkte lagen bei 320 bp (Basenpaare) für das manipulierte Kanalgen und 160 bp für das Wildtyp-Gen. Tiere, bei denen sich beide Banden zeigten, waren heterozygot und wurden nicht weiter verwendet.

Bei der Insertion der regulatorischen Kasette in das $K_{Ca}2.3$ -Gen kam es zur Deletion von 40 Codons einer Polyglutaminsequenz. Die dadurch entstehende Verkürzung des

Genes konnte in der PCR durch die Primer Glu Forward (bindet am 5'-Ende der Deletion) und Glu Reverse mit den folgenden Sequenzen detektiert werden.

Für die Genotypisierung des $K_{Ca}2.3$ -Gens wurden die Primer

Glu Forward: 5' – ATGGACACTTCTGGGCACTT – 3' und

Glu Reverse: 5' – AGAGTGCAACAGACCAGGAT – 3' verwendet.

Die erwartete Länge der Produkte dieser PCR waren 312 bp für das Wildtyp-Gen $K_{Ca}2.3$ und 190 bp für das verkürzte $K_{Ca}2.3^{T/T}$ -Gen. Wiederum wurden Proben, bei denen beide Banden zu sehen waren, als heterozygot eingeordnet. Für die PCR wurden 2,5 µl Zelllysat aus der Schwanzspitze der Tiere zu 22,5 µl der Reaktionslösung gegeben. Diese bestand aus 1x PCR Reaktionspuffer, 1,75 mmol/L $MgCl_2$, 400 µmol/L dNTP, 0,4 µmol/L von jedem Primer und 1.25 U Taq Polymerase (Fermentas).

Die Reaktion wurde mit einem Thermocycler (GeneAMP2700, ABI system, USA) mit dem folgenden Temperaturschritten ausgeführt: Denaturierung (94°C für 3 min), 10 Zyklen (35 sek bei 94°C, 35 sek bei 58°C and 50 sek bei 72°C) gefolgt von 25 Zyklen (35 sek bei 94°C, 35 sek bei 58°C und 50 sek bei 72°C mit 5 sek Verlängerung in jedem Schritt) und einem abschließenden Extensions-Schritt (10 min at 72°C). Die Reaktionsprodukte wurden in einem 1%igen Agarose-Gel durch Elektrophorese aufgetrennt und die Größe mit Hilfe eines Größenstandards (DNA-Sizer 100bp, Fermentas) bestimmt. Die Banden wurde durch Zugabe von Ethidiumbromid mit UV-Licht sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle wurde bei jedem PCR-Experiment ein Leerwert, d.h. das Reaktionsgemisch ohne Zusatz von DNA, mitbestimmt.

2.2 EXPERIMENTE

2.3.1 VERSUCHSVORBEREITUNG/ PRÄPARATION DER TIERE

Vor der Untersuchung bekamen die Wildtypen, die $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}3.1^{T/T}$ -Mäuse, die $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{+/+}$ -Mäuse und die $K_{Ca}3.1^{+/+}/K_{Ca}2.3^{T/T}$ -Mäuse für 14 Tage Doxyzyklin (2mg/ml) in 2%iger Sucroslösung verabreicht. Um Tiere zu erhalten, die den $K_{Ca}2.3$ -Kanal überexprimieren, wurde ebenfalls eine Gruppe von $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}3.1^{T/T}$ -Mäusen und eine Gruppe von $K_{Ca}3.1^{+/+}/K_{Ca}3.1^{T/T}$ -Mäusen ohne vorherige Doxyzyklin-Gabe untersucht.

Am Versuchstag wurden die Tiere aus der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums in das Labor gebracht. Nach der Bestimmung des Körpergewichts

wurden die Tiere in tiefer Ätherinhalationsnarkose getötet. Es erfolgte die Blutentnahme durch Herzpunktion und die Urinentnahme durch Blasenpunktion. Das Blut wurde durch Zentrifugieren in Plasma und Erythrozyten getrennt und anschließend bei -20°C eingefroren. Der Urin wurde durch einen handelsüblichen Urinstix-Schnelltest untersucht (Combur®, Roche). Den Tieren wurden Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Milz, Nieren, Thymus, Schilddrüse, Magen-Darm-Trakt und Blase entfernt und gewogen (Laborwaage Sartorius BP310P). Leber und Gehirn wurden unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Endothelzellisolation wurde die Arteria carotis communis (A.c.c.). entfernt und kurz in PBS-Puffer im Kühlschrank bei 4°C zwischengelagert. Für die Untersuchung am Druckmyographen wurde die linke und die rechte A.c.c. unter einem Stereomikroskop vorsichtig unter Vermeidung einer Überdehnung herauspräpariert und in eine gepufferte Salzlösung (PSS) überführt und bis zur Untersuchung am selben Tag im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.3.2 VERSUCHE AM DRUCKMYOGRAPHEN

Bei der Druckmyographie werden Experimente an Arterien von Versuchstieren in einem einfachen künstlichen Kreislauf durchgeführt. Im Gegensatz zu anderen Verfahren sind hier Vasoreagibilitätsmessungen unter nahezu physiologischen Bedingungen möglich. Insbesondere die funktionelle Interaktion zwischen Endothel und glatter Gefäßmuskulatur lässt sich letztlich nur am intakten Gefäß untersuchen. Intravasaler Druck, Perfusionsgeschwindigkeit und Temperatur werden während eines Experimentes konstant gehalten. Substanzen können intravasal und extravasal appliziert werden.

2.3.2.1 Versuchsaufbau

Unter dem Mikroskop wurde die präparierte Arteria carotis communis im Experimentierbad mit Knoten (chirurgisches Nahtmaterial) an zwei Glaspipetten befestigt. Diese Glaspipetten bildeten den Zu- und Abfluss, über den jeweils der Druck vor und hinter dem zu untersuchenden Gefäß kontrolliert werden konnte. Dies war durch zwei höhenverstellbare Flüssigkeitsbehälter möglich, die über ein Schlauchsystem mit dem Zu- bzw. Abfluss des Experimentierbades verbunden waren.

Der intravasale Druck wurde kontinuierlich von Drucksensoren an der zu- und abführenden Kapillare gemessen und aufgezeichnet. Die Temperatur des Puffers im Experimentierbad betrug konstant 37°C und wurde mit einer Temperatursonde kontinuierlich kontrolliert. Das Experimentierbad wurde auf dem Objekthalter eines inversen Mikroskops (Axiovert 100, Fa. Zeiss) befestigt. Mit einer am Mikroskop angeschlossenen digitalen Videokamera war es möglich, die Veränderungen des Gefäßdurchmessers kontinuierlich computergestützt aufzuzeichnen. Diese Veränderungen konnten auf dem angeschlossenen Monitor mit dem Programm VesselView1.0® direkt beobachtet werden. Zusätzlich wurden die Temperatur der Badlösung, der Gefäßdurchmesser in Mikrometern und der Druck am Zu- und Ablauf des Gefäßes angezeigt.

Durch einen Dreiwegehahn am Zufluss konnten über einen zusätzlichen Schlauch verschiedene Substanzen bzw. verschiedene Konzentrationen dieser Substanzen intravasal appliziert werden. Der hydrostatische Druck, der durch die Höhe der Gefäße erzeugt wurde, blieb dabei konstant, da sich die Flüssigkeitsspiegel der zuführenden Flüssigkeitsbehälter auf gleicher Höhe befanden. Insbesondere bei einem Wechsel von Substanzen (z.B. von Azetylcholin zu Dextran) wurde durch mehrmaliges Spülen des zuführenden Systems mit normalem PSS-Puffer darauf geachtet, keine Spuren der vorangegangenen Substanz zu verschleppen.

Die Bad- und Perfusionslösung war eine physiologische Salzlösung (PSS-Lösung). Die Lösung bestand aus (in mmol/L): 145 NaCl, 1.2 NaH₂PO₄, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 2.0 CaCl₂, 5.0 Glukose, 2.0 Pyruvat, und 3.0 3-[N-morpholino] propane sulfonic acid (MOPS). Die Lösung enthielt in einem Teil der Experimente zusätzlich den NO-Synthase-Inhibitor N_G-Nitro-L-Arginin (L-NNA, 300 µmol/L) sowie den Zyklooxygenase-Inhibitor Indomethazin (10 µmol/L) zur Unterbindung sowohl der NO- als auch der Prostazyklin-Synthese. Der pH-Wert des Puffers betrug 7,4.

In **Abbildung 2.1** wird der Versuchsaufbau schematisch dargestellt:

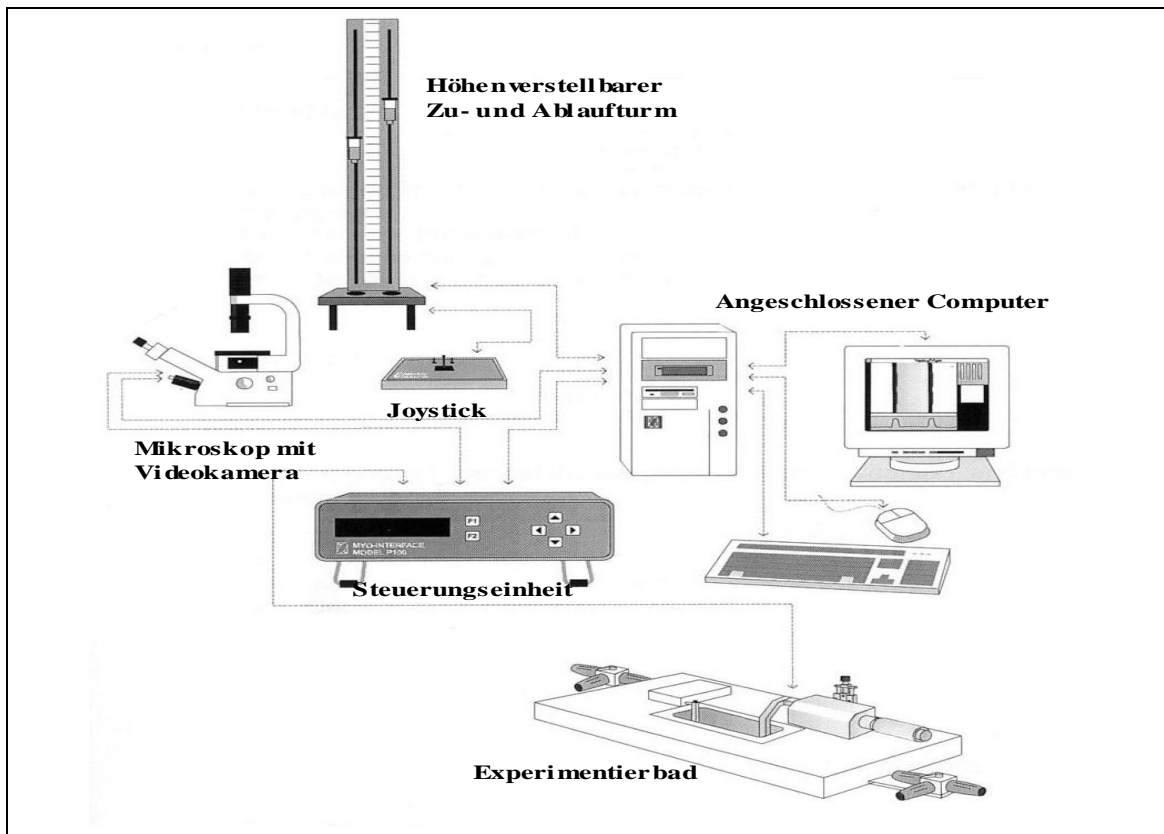


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Aufbaus des Druckmyographen (Abb. nach: Pressure Myograph-Model P100 J.P.Trading Bedienungsanleitung).

2.3.2.2 Versuchsablauf

Nach der Einstellung des Mikroskops wurde der Druck in Schritten von 20 mmHg von 0 auf 80 mmHg erhöht und die Werte der passiven Gefäßdehnung registriert. Danach wurde eine Druckdifferenz von 1 mmHg zwischen Zulauf und Ablauf eingestellt, um eine minimale Durchflussrate des Puffers zu erhalten. Nach einer initialen Äquilibrationsphase von 30 min wurde die A.c.c. mit 1 $\mu\text{mol/L}$ Phenylephrin in der Badlösung vorkontrahiert. Nachdem sich ein stabiler Vasotonus eingestellt hatte, wurde zunächst innerhalb von 5 s eine Druckdifferenz von 20 mmHg angelegt, um die flussinduzierte Vasodilatation zu untersuchen. Bei diesem Manöver erhöht sich die Durchflussrate rasch von ca. 30 auf 600 $\mu\text{l/min}$.

Die EDHF-abhängige Vasodilatation, die unabhängig von NO und Prostazyklin ist, wurde durch steigende Konzentrationen von Azetylcholin (in Anwesenheit von L-NNA und Indomethazin) in der Perfusionslösung untersucht (ACh, 1 nmol/L bis 10 $\mu\text{mol/L}$).

Azetylcholin bindet an G-Protein-gekoppelte muskarinerge Cholinorezeptoren und sorgt über die second messenger IP_3 (Inositoltrisphosphat) und DAG (Diazylglyzerol) für eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, was schließlich die K_{Ca} -Kanäle aktiviert (Feletou, Vanhoutte 2006).

Anschließend wurde das Gefäß mit einer 5%igen Dextranlösung (Dextran gelöst in PSS-Puffer) perfundiert, um die wandschubspannungsinduzierte Vasodilatation zu bestimmen. Diese Dextranlösung ist visköser als der PSS-Puffer und eignet sich deshalb besser dafür die Scherkräfte, die das strömende Blut auf die Gefäßwand ausübt, zu simulieren ohne die Flussrate zu erhöhen.

Um die maximale Vasokonstriktion zu bestimmen, wurde die Badlösung danach durch eine Pufferlösung mit 60 mmol/L KCl ersetzt, die anschließend wieder gegen die PSS-Lösung ausgetauscht wurde. Am Ende des Experiments wurde mit 1 μ mol/L Nitroprussid-Natrium (SNP) eine maximale Vasodilatation erzeugt. Alle Änderungen des Gefäßdurchmessers wurden als Prozentwert dieser maximalen Vasodilatation angegeben. Dasselbe Versuchsprotokoll wurde danach unter sonst gleichen Versuchsbedingungen anschließend ohne L-NNA und Indomethazin an der zweiten Arteria carotis communis des jeweiligen Versuchstieres durchgeführt, um die gesamte vasodilatatorische Funktion inklusive NO und Prostazyklin des Gefäßes zu untersuchen.

2.3.2.3 Datenaufzeichnung

Die Änderungen im Gefäßdurchmesser wurden mit dem Programm „Vessel View 1.0“ kontinuierlich aufgezeichnet. Die Änderungen wurden als Prozentwert der maximalen Vasodilatation (Vasodilatation auf 1 μ mol/L SNP) angegeben.

2.3.3 PATCH-CLAMP UNTERSUCHUNGEN

2.3.3.1 Grundprinzip

Um die Funktion von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ auf zellulärer Ebene zu untersuchen und Auswirkungen der verschiedenen Genotypen der Versuchstiere auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellmembran nachzuweisen, wurde die Patch-Clamp-Technik eingesetzt. Mit ihr ist es möglich, sowohl das Membranpotential von Zellen als auch die Aktivität einzelner Ionenkanal-Proteine zu untersuchen (Neher, Sakmann 1976; Numberger, Draguhn 1996). Die Patch-Clamp-Technik ermöglicht es dem Untersucher, während eines Experiments die intrazellulären und extrazellulären Ionenkonzentrationen zu verändern und mit inhibitorischen und aktivierenden Substanzen Einfluss auf die Aktivität von Ionenkanälen zu nehmen. Mit Hilfe der Spannungs-klemme wird das Membranpotential auf einen definierten Wert eingestellt. Wenn sich nun Ionenkanäle öffnen oder schließen, wird vom Verstärker ein Kompensationsstrom erzeugt, der genau so groß ist, wie der durch die Membran fließende Strom. Dieser Kompensationsstrom wird gemessen und ist ein indirektes Maße für die Aktivität der betreffenden Ionenkanäle.

Die Patch-Clamp-Untersuchungen wurden in dieser Studie im Ganzzellstrom-Messmodus (Whole-Cell) durchgeführt.

Whole-Cell-Modus

Zunächst wird die Mikropipette mit Hilfe des Mikromanipulators so positioniert, dass die Spitze (Durchmesser ca. $1\mu m$) die Zellmembran berührt. An die Mikropipette wird ein Unterdruck angelegt und so ein kleiner Membranbereich, der sogenannte „Patch“, angesaugt. Es entsteht hierbei eine hohe elektrische Abdichtung, das sog „seal“, wodurch der Membranpatch von der Umgebung elektrisch isoliert wird (hoher elektrischer Widerstand, über $1G\Omega$). Ist dieses Giga-Ohm-Seal erreicht, gelangt man nun zum Whole-Cell-Modus, in dem man durch kurzes Anlegen eines starken Unterdruckes den angesaugten Membranfleck herausreißt. Dadurch wird ein direkter elektrischer Zugang der Patchpipette mit der Elektrode zum Zytoplasma gewährleistet, während die Badelektrode im Experimentierbad liegt (**Abb. 2.2**). Die dann registrierbaren Ströme entsprechen der Summe der Einzelkanalströme der gesamten Zellmembran. In dieser Konfiguration ist also die Messung der Ganzzellströme über die Spannungs-klemme möglich.

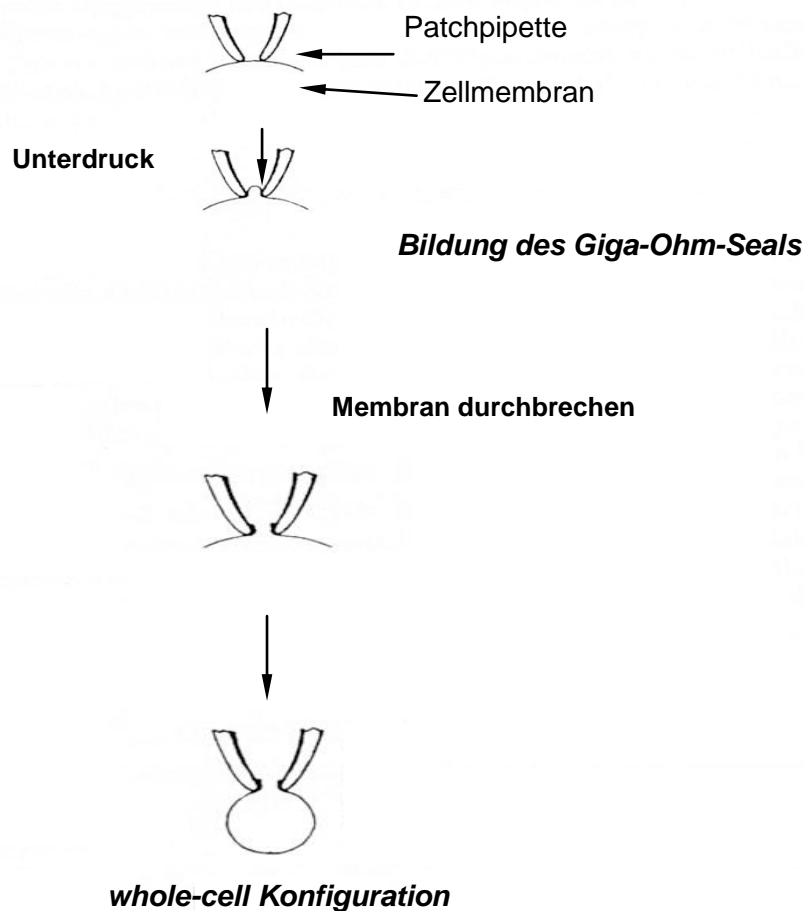


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Whole-Cell-Modus bei der Patch-Clamp-Untersuchung.

Die Spitze der Mikropipette (Durchmesser ca. $1\mu\text{m}$) berührt zunächst die Zellmembran. An die Mikropipette wird ein Unterdruck angelegt und so ein kleiner Membranbereich, der sog. „Patch“, angesaugt. Dieser wird dabei elektrisch isoliert (hoher elektrischer Widerstand, über $1\text{G}\Omega$). Ist dieses sogenannte Giga-Ohm-Seal erreicht, gelangt man nun zum Whole-Cell-Modus, in dem man durch kurzes Anlegen eines Unterdruckes den angesaugten Patch herausreißt. Dadurch entsteht ein direkter Zugang der Patchpipette mit der Elektrode zum Zytoplasma gewährleistet, während die Badelektrode im Experimentierbad liegt (Abb. nach Hamill et al. 1981)

2.3.3.2 Versuchsaufbau:

Messanordnung und Mikroskop wurden auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert. Zur elektrischen Abschirmung des Messplatzes wurde er mit einem Faradaykäfig aus einem Kupferdrahtgitter umgeben, und alle leitenden Komponenten wurden über einen gemeinsamen Massepunkt geerdet. Das Experimentierbad wurde auf dem Objekthalter eines inversen Mikroskops (Axiovert, Fa. Zeiss) befestigt.

Die Patchpipetten wurden aus 7,5 cm langen polierten Borosilikatkapillaren (Innendurchmesser 0,9 mm, Wandstärke 0,3 mm) mit einem automatischen

Pipettenziehgerät in drei Zugintervallen hergestellt. Der elektrische Widerstand der so erhaltenen Patchpipetten betrug 2-4 M Ω in symmetrischer KCl-Lösung.

Anschließend wurden die Pipetten in der Pipettenhalterung eines Mikromanipulators befestigt, mit dem eine genaue Bewegung und Positionierung der Patchpipette in alle drei Raumebenen möglich war. Als Mess- und Referenzelektrode wurde ein chlorierter Silberdraht (Ag/AgCl-Elektrode) eingesetzt. Der Druck in der Patchpipette konnte über ein Schlauchsystem variiert werden.

2.3.3.3 Aufbau des Messkreises

Abbildung 2.3 zeigt den schematischen Aufbau des Messkreises. An den beiden Eingängen des Operationsverstärkers (OPA = operation amplifier) liegen die Spannungen der Pipette U_{pip} sowie die vorgegebene Sollspannung U_{soll} an. Besteht zwischen Pipetten- und Sollpotential eine Differenz, dann entsteht am Ausgang des OPA eine Spannung, die proportional ist zu dieser Abweichung, deren Absolutwert jedoch verstärkt ist. Der Eingang des OPA ist mit seinem Ausgang über einen Rückkopplungswiderstand R_f verschaltet. Besteht eine Potentialdifferenz, muss durch R_f ein Strom fließen, da die Spannung zwischen Punkt 1 (U_{pip}) und Punkt 2 verschieden ist. An R_f entsteht eine Spannung, die proportional zum fließenden Strom ist ($U = R \times I$). Der Kompensationsstrom I_f wird gemessen und fließt solange, bis die Spannungsdifferenz an den Eingängen des Operationsverstärkers ausgeglichen ist (Numberger, Draguhn 1996).

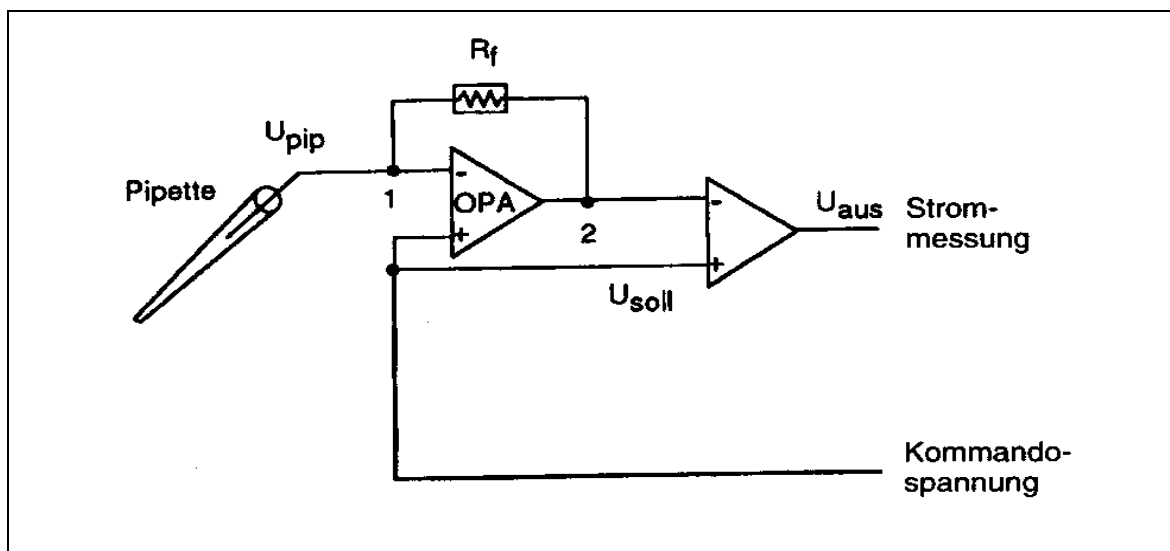


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Patch-Clamp-Schaltkreises. OPA= Operationsverstärker, U_{pip} = Pipettenpotential, U_{soll} = Kommando- oder Sollspannung, R_f : Rückkopplungswiderstand, U_{aus} = Ausgangsspannung. (Abbildung aus Numberger, Draguhn 1996)

2.3.3.4 Versuchsablauf

Zur Gewinnung der Endothelzellen wurden Versuchstieren die Arteria carotis communis entfernt und in eine Petrischale mit PBS-Puffer ohne Ca^{2+} überführt. Unter dem Mikroskop wurden die Gefäße dann in den Myographen eingespannt. Vor der Isolation wurde die A.c.c. mit 0,05% Trypsinlösung über die Glaskapillaren gefüllt und dann für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Endothelzellen wurden danach ausgewaschen und unter sterilen Bedingungen in eine MEM-Earle-Lösung überführt. Die Endothelzellen wurden ca. fünf Stunden nach Isolation mit der Patch-Clamp-Technik untersucht.

Zu Beginn des Experiments wurde, wie bereits beschrieben, die Whole-Cell-Konfiguration hergestellt. Im Whole-Cell-Modus wurde die Messung der Ganzzellströme über die Spannungsklemme, durchgeführt. Um später die Stromstärke in Beziehung auf die Zellgröße normieren zu können, wurde die Kapazität jeder Zelle bestimmt, welche im proportionalen Verhältnis zur Zellgröße steht (Numberger, Draguhn 1996).

Zur Aktivierung der K_{Ca} -Ströme wurden die Zellen mit einer Pipettenlösung mit 3 mmol/L Ca^{2+} dialysiert. Um die Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ und $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ identifizieren zu können, wurden die jeweiligen selektiven Blockersubstanzen TRAM-34 und UCL1684 (Konzentration jeweils $1\mu\text{mol/L}$) allein oder in Kombination in die Badlösung gegeben.

2.3.3.5 Datenaufzeichnung und Auswertung

Die Gesamtzellströme wurden mit dem Programm „Pulse“ (Fa. HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) aufgezeichnet. Hierbei wurden zur Messung von Gesamtzellströmen Spannungsrampen von -100 mV bis $+100\text{ mV}$ mit einer Dauer von 1 s verwendet (Köhler et al., 2000). Die Messdaten wurden mit einem Analog-Digital-Wandler digitalisiert, mit dem Computer registriert und anschließend auf Festplatte gespeichert. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Programm „Pulsefit“ (ebenfalls Fa. HEKA Elektronik). Zur Ermittlung der Stromstärke wurden Strom-Spannungskurven erstellt, sodass den angelegten Klemmpotentialen die gemessenen Stromwerte direkt zugeordnet werden konnten.

Mit Hilfe der ebenfalls bestimmten Zellkapazität, die ein proportionales Maß für die Zellgröße ist, erfolgte die Normierung des Stroms pro Flächeneinheit (Strom-Kapazitätsquotient in pA/pF).

2.3.4 MEMBRANPOTENZIALMESSUNGEN IN SITU AN GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN

Um das Membranpotenzial der glatten Gefäßmuskelzellen in situ messen zu können, wurde die Sharp-Electrode-Technik angewandt. Die A.c.c. wurden, wie bereits oben beschrieben, im Experimentierbad des Druckmyographen befestigt. Die Membranpotenziale wurden in Anwesenheit von L-NNA (300µmol/L) und Indomethazin (10µmol/L) bestimmt. Besonders dünn ausgezogene Glaspipetten (Spitzenwiderstand von 80-100 MΩ), gefüllt mit 0.5 mol/L KCl, wurden unter dem Mikroskop durch die Adventitia bis in die Media vorgeschoben. Zur Darstellung der Membranpotenziale wurde ein Verstärker (BA-1s, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) verwendet.

Eine Verschiebung des gemessenen Potenzials zu negativeren Werten zeigte die erfolgreiche Penetration der Zelle an. In den Experimenten, bei denen ein stabiles Membranpotenzial über 20-30 sek gemessen wurde, erfolgte anschließend eine Perfusion mit 100 nmolarer ACh-Lösung. Die Veränderung des Membranpotenzials wurde aufgezeichnet.

2.3.5 BLUTDRUCKMESSUNG

Zur Untersuchung der Auswirkung der verschiedenen Genotypen der Versuchsgruppen auf den systemischen arteriellen Blutdruck und die Herzfrequenz wurden telemetrische Messungen vorgenommen.

Vor der Implantation der TA11PA-C10 Messeinheit (Data Sciences International, St. Paul, MN) wurde der sogenannte "zero offset" gemessen und die Messeinheit in 0.9% NaCl eingelegt. Die Mäuse wurden mit Isofluran (Baxter) anästhesiert. Der Katheter mit dem Blutdrucksensor wurde über die rechte Femoralarterie bis in die Aorta abdominalis vorgeschoben, während der Sender subkutan im Bereich der rechten Flanke platziert wurde. Die Implantation wurde freundlicherweise von Dr. Christoph Busch, Klinik für Nephrologie, Universitätsklinikum Marburg durchgeführt. Um eine Auskühlung der Tiere während der Operation und in der nachfolgenden Erholungsphase zu verhindern, wurden die Tiere in dieser Zeit durch eine Infrarotlampe gewärmt. Vor dem Beginn der ersten Messung bekamen die Tiere sieben Tage Zeit zur Erholung von der Operation. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter (siehe oben) und Wasser.

Die gewonnenen Daten wurden von der TA11PA-C10 Messeinheit mit UKW-Signalen an einen Empfänger unter dem Käfig gesendet und mit dem DataQuest ART system,

version 2.1 (Data Sciences International) aufgezeichnet. Dadurch war es möglich, gleichzeitig Signale von verschiedenen Tieren zu empfangen und auszuwerten.

Die Daten wurden Tag und Nacht kontinuierlich aufgezeichnet und auf der Festplatte des Computers gespeichert. Der systolische und diastolische Blutdruck wurden zusammen mit der Herzfrequenz und der Aktivität der Tiere mit der Dataquest Software 2.1 aufgezeichnet. Die Herzfrequenz wurde anhand der Pulsintervalle der Blutdruckmessungen berechnet.

2.4 STATISTISCHE ANALYSEN

Die Datensätze der einzelnen Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des „One- ANOVA- Tests“ miteinander verglichen. Bei Mehrfachvergleichen der Mittelwerte erfolgte eine Korrektur der P-Werte nach der Newmann-Keuls-Methode. P-Werte < 0.05 wurden als signifikant (*), und < 0.01 als hoch signifikant (**) erachtet. Die Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistischen Berechnungen wurden mit den Programmen Origin®6.1 and SigmaStat©2.03 durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 GENERIERUNG DER VERSUCHSTIERE

3.1.1 TIERZUCHT

Das erste Ziel war, aus den bereits vorhandenen $K_{Ca2.3}^{T/T}$ - und $K_{Ca3.1}^{-/-}$ - Linien doppeltransgene Linien mit dem Genotyp $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ zu generieren. Hierbei wurden die beiden Allele unabhängig (da auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert) entsprechend der Mendelschen Regeln vererbt. Aus Elternpaaren, bei denen ein Elter homozygot für das $K_{Ca3.1}^{-}$ -Gen und der andere Elter homozygot für das $K_{Ca2.3}^T$ -Gen war, entstand eine F1-Generation von Tieren, die ausschließlich heterozygot für beide Gene waren ($K_{Ca3.1}^{+/-}/K_{Ca2.3}^{+T}$). Aus Zuchtpaaren dieser Generation entstanden Nachkommen (F₂-Generation), die jeweils zu ¼ homozygot für das $K_{Ca3.1}$ -Wild-Allel und das Knockout-Allel waren, und zur Hälfte einen heterozygoten Genotyp zeigten. In diesem Verhältnis (1:2:1) verteilten sich auch die Genotypen für das $K_{Ca2.3}$ -Gen. Jeweils 1/16 der Tiere wies einen homozygoten Genotyp für beide veränderten Gene ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$) bzw. für beide Wildtypgene ($K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{+/+}$) auf.

Aus den Tieren der F₂-Generation wurden anschließend Zuchtpaare gebildet, bei denen beide Eltern homozygot für das $K_{Ca2.3}^T$ -Gen und homozygot für das $K_{Ca3.1}^{-}$ -Gen waren ($K_{Ca2.3}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$). Die Nachkommen dieser Zuchtpaare zeigten erwartungsgemäß ausschließlich denselben Genotyp wie ihre Eltern.

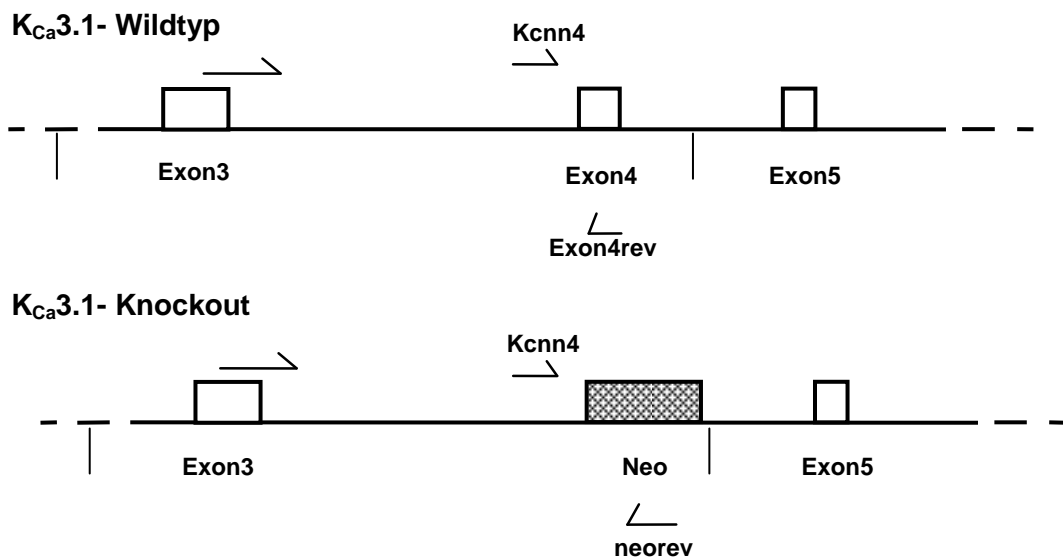
Die Tiere zeigten während der Zucht keine erkennbaren Auffälligkeiten. Sie waren gesund und wiesen eine normale Aktivität auf. Sie zeigten ein normales Paarungsverhalten und waren in der Lage, gesunde Nachkommen zu gebären. Wie bereits im Methodenteil erwähnt, wurden alle Muttertiere, die homozygot für das $K_{Ca2.3}^T$ -Gen waren, vor der Geburt fünf Tage mit Doxzyklin behandelt, um die beschriebenen Probleme (siehe Einleitung) beim Geburtsvorgang zu vermeiden. Unter dieser Behandlung konnten die Tiere ihre Nachkommen problemlos aus dem Geburtskanal austreiben. Die Gabe von Doxzyklin über mehrere Tage führte ebenfalls zu keinen erkennbaren Auffälligkeiten der Tiere.

3.1.2 GENOTYPISIERUNG

Die Genotypisierung der Tiere wurde für das $K_{Ca3.1}$ -Gen mit den Primern Exon4rev, Kcnn4 und Neorev (Sequenzen siehe Methodenteil) ausgeführt. Bei dem Knockout-Gen

ist das Exon4 des nativen $K_{Ca}3.1$ -Gens durch das Neomycin-Resistenzgen ersetzt. Der Kcnn4-Primer lagert sich an das Intron an, das vor dem Exon 4 des $K_{Ca}3.1$ Gens liegt. Der Exon4rev-Primer ist spezifisch für das Exon 4 und der Neorev-Primer bindet an das Neomycin-Resistenzgen (siehe Abbildung 3.1 A). Somit ergab die Multiplex-PCR ein Produkt von 160 bp bei homozygoten Wildtyptieren und ein Produkt von 320 bp bei Tieren mit dem $K_{Ca}3.1^{-}$ -Gen (Exon 4 durch das Neo-Gen ersetzt). Bei heterozygotem Genotyp zeigte sich sowohl eine Bande bei 320 bp, als auch eine Bande bei 160 bp (siehe Abbildung 3.2) .

A



B

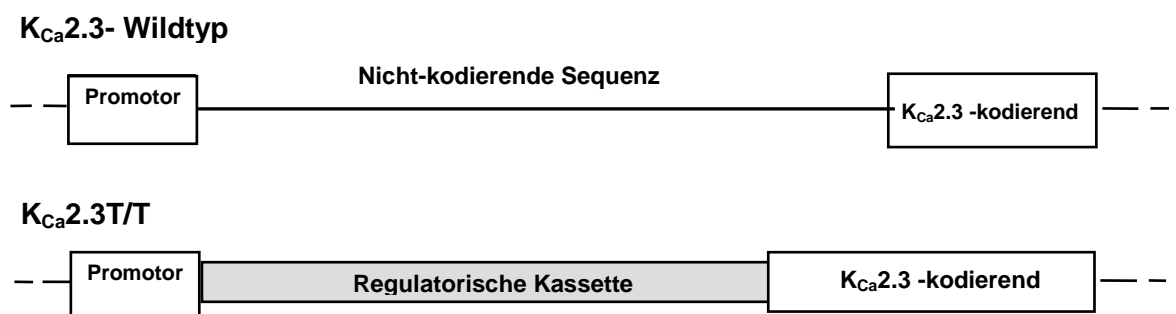


Abbildung 3.1: Genotypisierung durch Multiplex-PCR. A. $K_{Ca}3.1$: Lokalisation der Bindungsstellen der PCR-Primer Exon4rev, Kcnn4, Neorev. Im $K_{Ca}3.1$ -KO-Gen wurde das Exon4 durch das längere Neomycin(neo)-Resistenz-Gen ersetzt (Abb. modifiziert nach Si, Heyken et. al. 2006) B. Im $K_{Ca}2.3^{T/T}$ -Gen wurde eine doozyklinsensitive regulatorische Kassette eingefügt die zum Verlust von ein Polyglutaminsequenz aus 40 Codons führt, der durch PCR nachgewiesen wird (Abb. modifiziert nach Bond, Sprengel et. al. 2000).

Durch das Einsetzen der regulatorischen Kassette in das $K_{Ca2.3}$ -Wildtypgen wurde eine N-terminale Polyglutaminsequenz von 40 Codons gelöscht. Diese Verkürzung im $K_{Ca2.3}$ -T-Gen wurde durch PCR mit den Primern GluForward und GluReverse (Sequenzen siehe Methodenteil) detektiert. Die Multiplex-PCR ergab ein Produkt von 312 bp bei homozygoten Wildtyptieren ($K_{Ca2.3}^{+/+}$) und ein Produkt von 190 bp bei Tieren, die homozygot für das $K_{Ca2.3}$ -T-Gen waren ($K_{Ca2.3}^{T/T}$). Bei heterozygotem Genotyp zeigte sich sowohl eine Bande bei 312 bp, als auch eine Bande bei 190 bp, da beide Allele vorhanden waren. (siehe **Abbildung 3.2**)

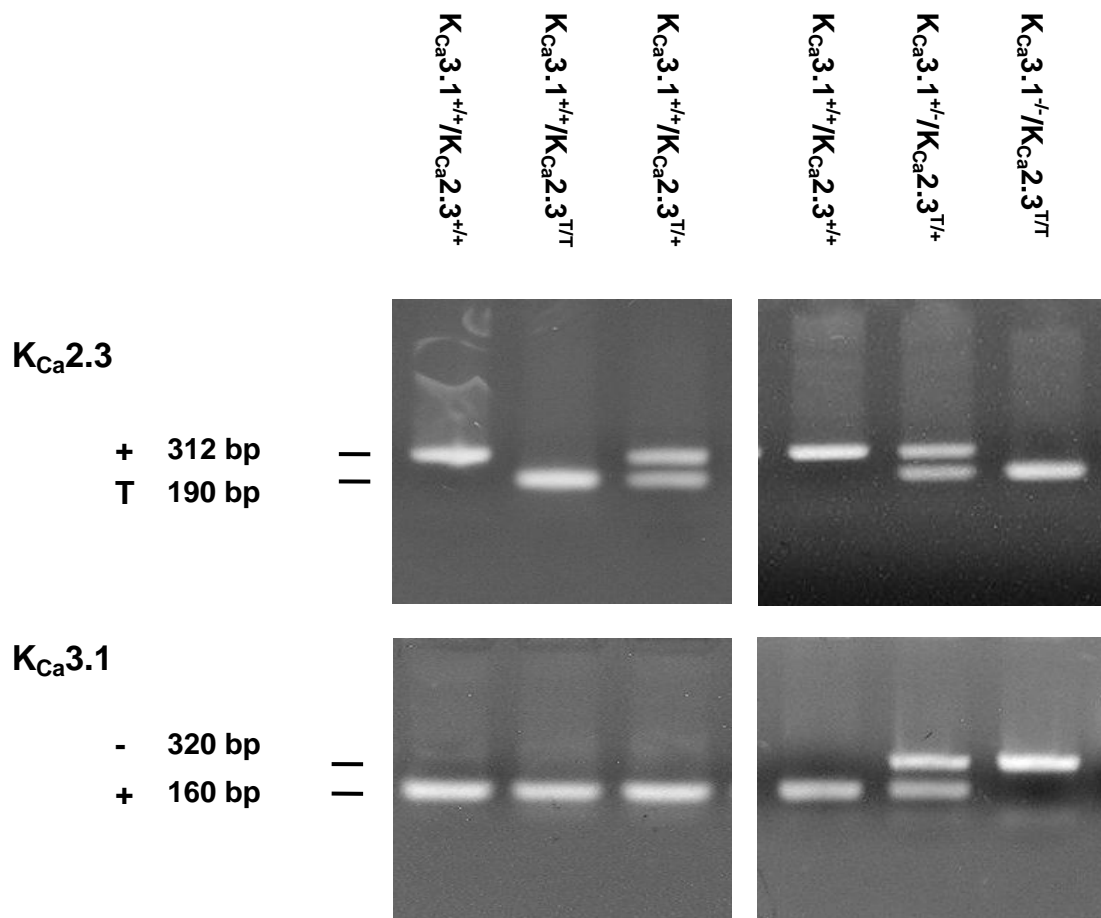


Abbildung 3.2: Exemplarische Darstellung der Gel-Elektrophorese-Produkte einer Multiplex PCR zur Genotypisierung der Versuchstiere. Die obere Beschriftung bezeichnet die Genotypen der untersuchten Tiere. Mit + ist jeweils die Bande des Wildtypgens bezeichnet, mit – das $K_{Ca3.1}$ -Knockoutgen und mit T das veränderte $K_{Ca2.3}$ -Gen. Zeigt sich nur eine Bande sind die Tiere homozygot, bei zwei Banden sind die Tiere heterozygot für das jeweiligen Gen.

3.2 PHÄNOTYPISIERUNG DER VERSUCHSTIERE

Die erste wichtige Frage, die geklärt werden sollte, war, ob die unterschiedlichen Genotypen erkennbare pathologische Veränderungen der Gestalt und Organmorphologie verursachten. Während der postnatalen Entwicklung und in adulten Tieren zeigten sich keine erkennbaren Veränderungen im Bezug auf Verhalten und Gesundheitszustand sowie allgemeine Erscheinung in den verschiedenen Linien. Körpergewicht. Organfeuchtgewichte von Herz, Lunge, Leber, Milz, Gastrointestinaltrakt, Nieren, Blase, Thymus und Schilddrüse zeigten keine signifikanten Unterschiede. Makroskopisch wiesen die Organe keine erkennbaren pathologischen Veränderungen auf. Die Untersuchung des unter sterilen Bedingungen entnommenen Blasenpunktionsurins mit Hilfe eines Urinteststreifens ergab keine Hinweise auf pathologische Veränderungen der Nierenfunktion bzw. auf pathologische Prozesse im Urogenitaltrakt.

3.3 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG MIT DER PATCH-CLAMP- UND DER SHARP-ELECTRODE-TECHNIK

3.3.1 PATCH-CLAMP-UNTERSUCHUNGEN IM WHOLE-CELL-MODUS

Um die Auswirkung des genetischen Knockouts auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden Patch-Clamp-Experimente im Whole-Cell-Modus (siehe genaue Erklärung im Methodenteil) an frisch isolierten Endothelzellen aus der Arteria carotis communis (CAEC = Carotide Artery Endothelial Cells) vorgenommen.

Zur Aktivierung der K_{Ca} -Ströme wurden die Zellen mit einer Patchpipettenlösung, die 3 μM $[Ca^{2+}]_{frei}$ enthielt, dialysiert. Bei Wildtyptieren ($K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{+/+}$) konnten so Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Auswärtsströme erzeugt werden, die eine leichte Einwärtsrektifizierung aufwiesen. Das Umkehrpotential dieser Ca^{2+} -aktivierten Ströme lag bei ca. -80 mV und somit beim zu erwartenden Kaliumgleichgewichtspotential bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 5mM und einer intrazellulären Kaliumkonzentration von 140 mM mmol/L.

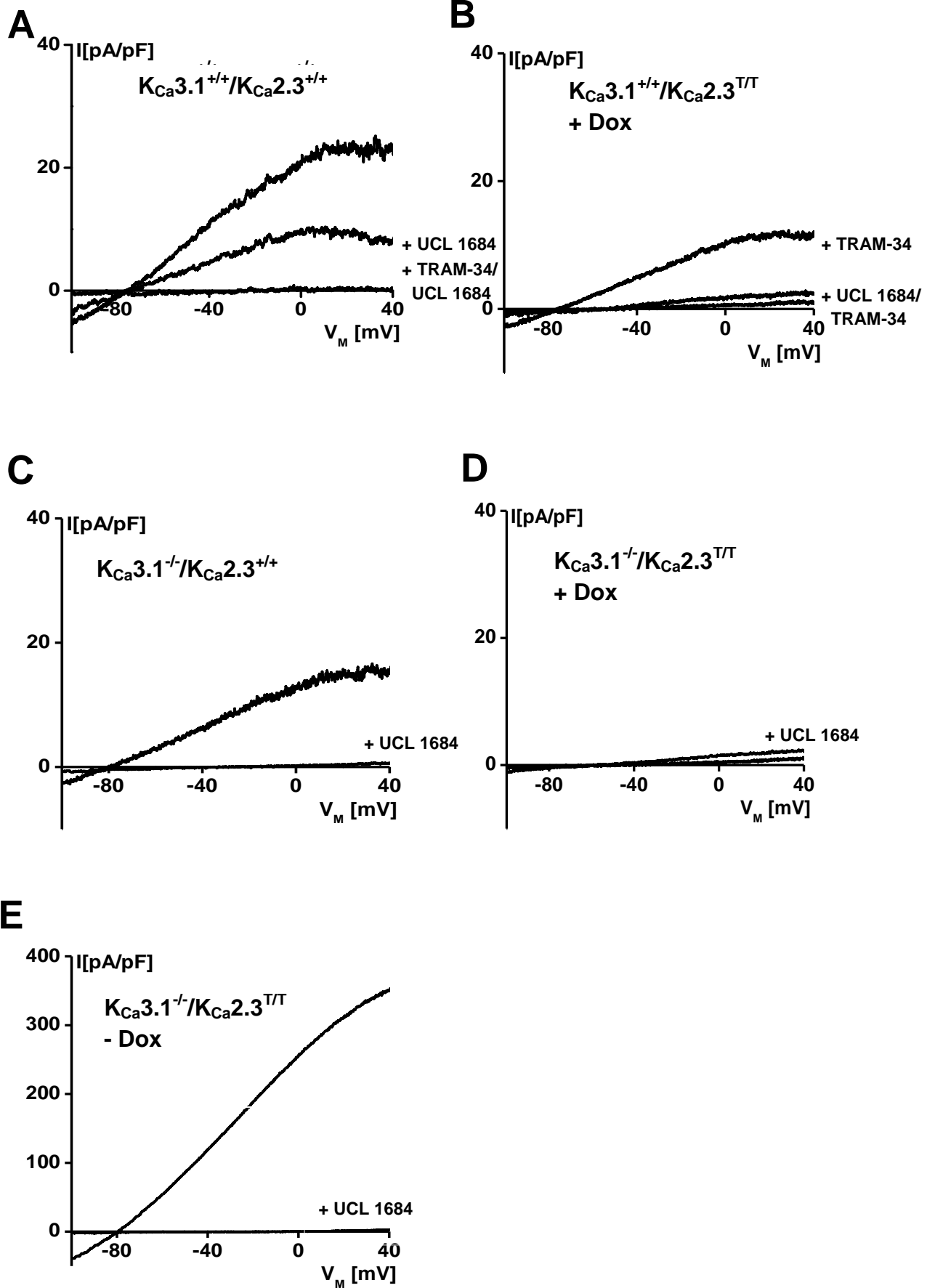
Zum Nachweis, dass es sich bei diesen Strömen der Wildtypzellen um die Ströme von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ handelte, wurden außerdem die Blockersubstanzen UCL1684 (selektiv für $K_{Ca2.3}$) und TRAM-34 (selektiv für $K_{Ca3.1}$) in die Badlösung zu geben. Mit 1 μ mol/L UCL1684 war ca. die Hälfte des Stromes inhibierbar. Die Kombination

von 1 $\mu\text{mol/L}$ UCL1684 und 1 $\mu\text{mol/L}$ TRAM-34 konnte den Strom vollständig unterdrücken (**Abb. 3.3 A**).

Zellen des Genotyps $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{T/T}$, die durch Doxyzyklinbehandlung keinen $K_{Ca2.3}$, jedoch $K_{Ca3.1}$ exprimierten, zeigten eine Reduktion des K_{Ca} -Stromes um ca. 50% (siehe **Abb. 3.3 B**). Die Zugabe von 1 $\mu\text{mol/L}$ TRAM-34 bewirkte eine fast vollständige Blockierung dieses Stromes. Der kleine verbleibende Reststrom war UCL1684-sensitiv, wurde also von wenigen verbliebenen $K_{Ca2.3}$ -Kanälen gebildet. Bei Zellen mit $K_{Ca3.1}$ -Knockout und intaktem $K_{Ca2.3}$ -Kanal ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{+/+}$, siehe **Abb. 3.3 C**) zeigte sich ebenfalls eine Reduktion des K_{Ca} -Stromes um ca. 50%. Dieser Strom war durch den $K_{Ca3.1}$ -Blocker TRAM-34 nicht inhibierbar, ließ sich aber mit dem $K_{Ca2.3}$ -Blocker UCL1684 vollständig blockieren.

Bei CAEC-Zellen der $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Tiere war nach Doxyzyklinbehandlung der K_{Ca} -Strom bis auf einen minimalen Reststrom nicht mehr nachweisbar (siehe **Abb. 3.3 D**). Dieser Reststrom war TRAM-34-insensitiv, jedoch sensitiv für die Blockade mit UCL1684. CAEC-Zellen mit einer Überexpression von $K_{Ca2.3}$ und einem Knockout von $K_{Ca3.1}$ ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ ohne Dox) zeigten einen um den Faktor zehn erhöhten K_{Ca} -Strom gegenüber dem kombinierten $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ -Strom bei Wildtyptieren (**Abb. 3.3 E**). Dieser Strom konnte durch Zugabe von TRAM-34 nicht beeinflusst werden, ließ sich aber durch UCL1684 unterdrücken.

Die Patch-Clamp-Untersuchungen ergaben somit, dass in Abwesenheit der Kanalproteine $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ der hyperpolarisierende K_{Ca} -Strom praktisch nicht mehr vorhanden war, und dass die verschiedenen Genotypen der Versuchsgruppen zu den erwarteten Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften der Endothelzellen führten.



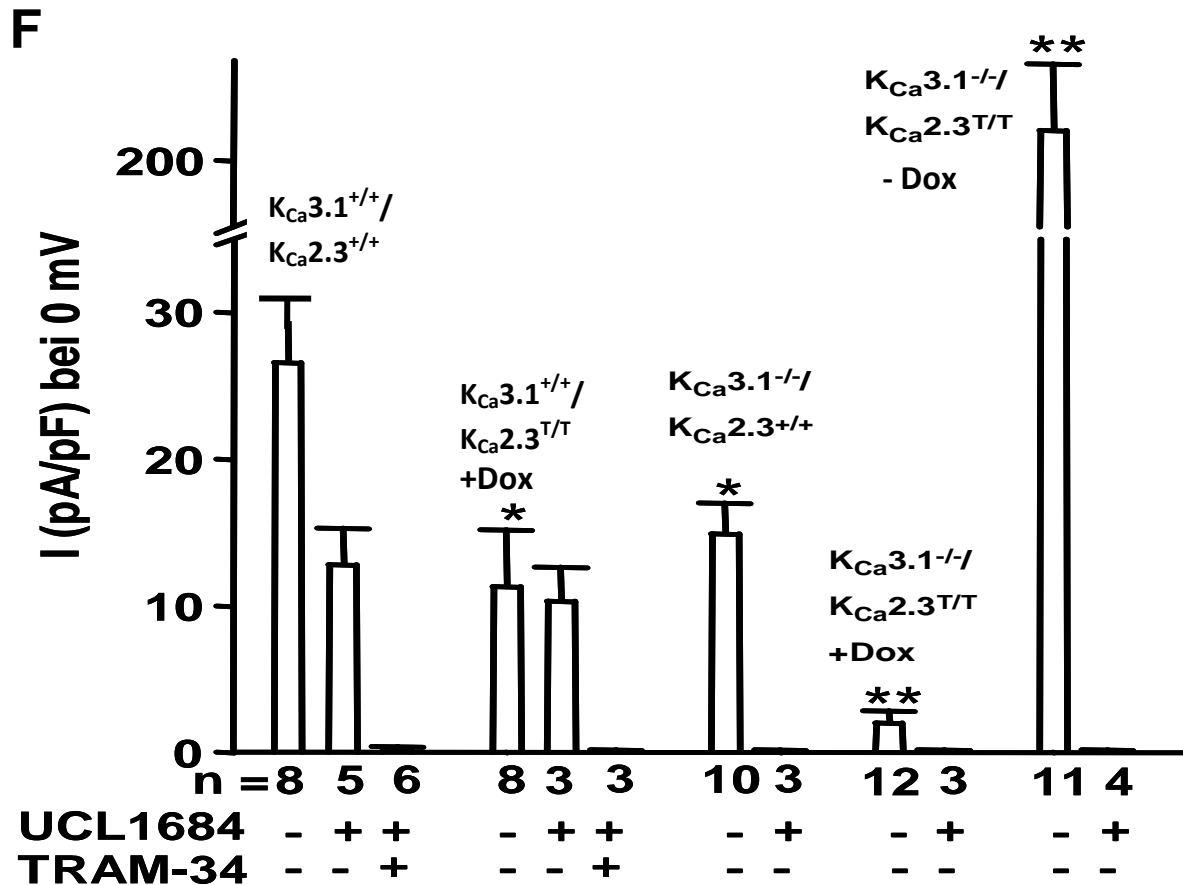


Abbildung 3.3: Patch-Clamp-Experimente im Whole-Cell-Modus an frisch isolierten CAEC (carotide artery endothelial cells):

A: Darstellung der Strom-Spannungsbeziehung und deren Veränderung durch Zugabe der Inhibitoren TRAM-34 (1 μ mol/L) und UCL1684 (1 μ mol/L): $K_{Ca}3.1^{+/+}/K_{Ca}2.3^{+/+}$ (Wildtyp), die Ströme wurden durch Zugabe von UCL 1684 um ca. 50% reduziert und durch Kombination mit TRAM-34 vollständig blockiert **B:** $K_{Ca}3.1^{+/+}/K_{Ca}3.1^{T/T}$ (+Dox), der reduzierte, vor allem $K_{Ca}3.1$ -medierte Reststrom, war durch TRAM-34 inhibierbar **C:** reduzierter Strom bei $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{+/+}$ - Zellen und Inhibition des Reststroms durch UCL 1684. **D:** $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T}$ (+Dox), fast vollständige Reduktion des Gesamtstromes und Inhibition eines minimalen Reststroms durch UCL 1684 **E:** $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T}$ (- Dox), die Überexpression führte zu starken, UCL 1684- sensitiven, Strömen **F:** statistische Zusammenfassung der Ergebnisse bei 0 mV für alle Gruppen, n = Anzahl der gemessenen Endothelzellen, * $p < 0,05$ gegenüber Wildtypgruppe, ** $p < 0,01$ gegenüber Wildtypgruppe; one-way-ANOVA gefolgt durch Newman-Keuls post-hoc-Test.

3.3.2 MEMBRANPOTENZIALMESSUNG MIT DER SHARP-ELECTRODE-TECHNIK

Mit der Sharp-Electrode-Technik sollte festgestellt werden, ob die genetische Veränderung der Expression der beiden Ionenkanäle auch Auswirkungen auf die Hyperpolarisation der Gefäßmuskulatur durch einen Azetylcholinstimulus hat. Hierzu wurde die vorkontrahierte (Phenylephrin 1 $\mu\text{mol/L}$) Arteria carotis communis (A.c.c.) bei einem intravasalen Druck von 80 mmHg im Myographen mit Azetylcholin (100 nmol/L) stimuliert und die Membranpotenzialveränderungen aufgezeichnet. **Abbildung 3.4** zeigt repräsentative Aufzeichnungen der Ruhemembranpotenziale und der Potenzialveränderungen auf den intravasalen Acetylcholinstimulus bei den verschiedenen Genotypen, sowie den statistischen Vergleich der Daten.

In Wildtypgefäßen erzeugte Azetylcholin eine starke Hyperpolarisation von einem Ruhemembranpotenzial von -40 ± 1 auf -61 ± 4 mV. Die Unterdrückung der $K_{Ca2.3}$ -Expression in A.c.c. von doxyzyklinbehandelten $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Mäusen reduzierte signifikant diese Hyperpolarisation gegenüber Wildtypmäusen (Hyperpolarisation von -40 ± 1 auf -57 ± 1 mV, $P < 0.05$ gegenüber Wildtypmäusen). Bei $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{+/+}$ -Gefäßen, also ohne Expression von $K_{Ca3.1}$, konnte eine noch deutlichere Reduktion der Hyperpolarisation beobachtet werden (von -40 ± 1 auf -51 ± 1 mV, $p < 0.01$ vs. WT und vs. $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{T/T}$). Demgegenüber zeigten A.c.c., bei denen die Expression beider Kanäle unterdrückt war ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ mit Doxyzyklinbehandlung), nur noch eine Hyperpolarisation von -39 ± 1 auf -45 ± 1 mV, und damit eine signifikante Reduktion gegenüber allen anderen Gruppen ($P < 0.01$).

Im Gegensatz dazu führte die $K_{Ca2.3}$ -Überexpression bei gleichzeitiger Abwesenheit von $K_{Ca3.1}$ ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ ohne Dox) zu einer Wiederherstellung der Hyperpolarisation auf ähnliche Werte wie bei den Wildtypgefäßen (von einem Ruhemembranpotenzial von -39 ± 1 auf -58 ± 1 mV).

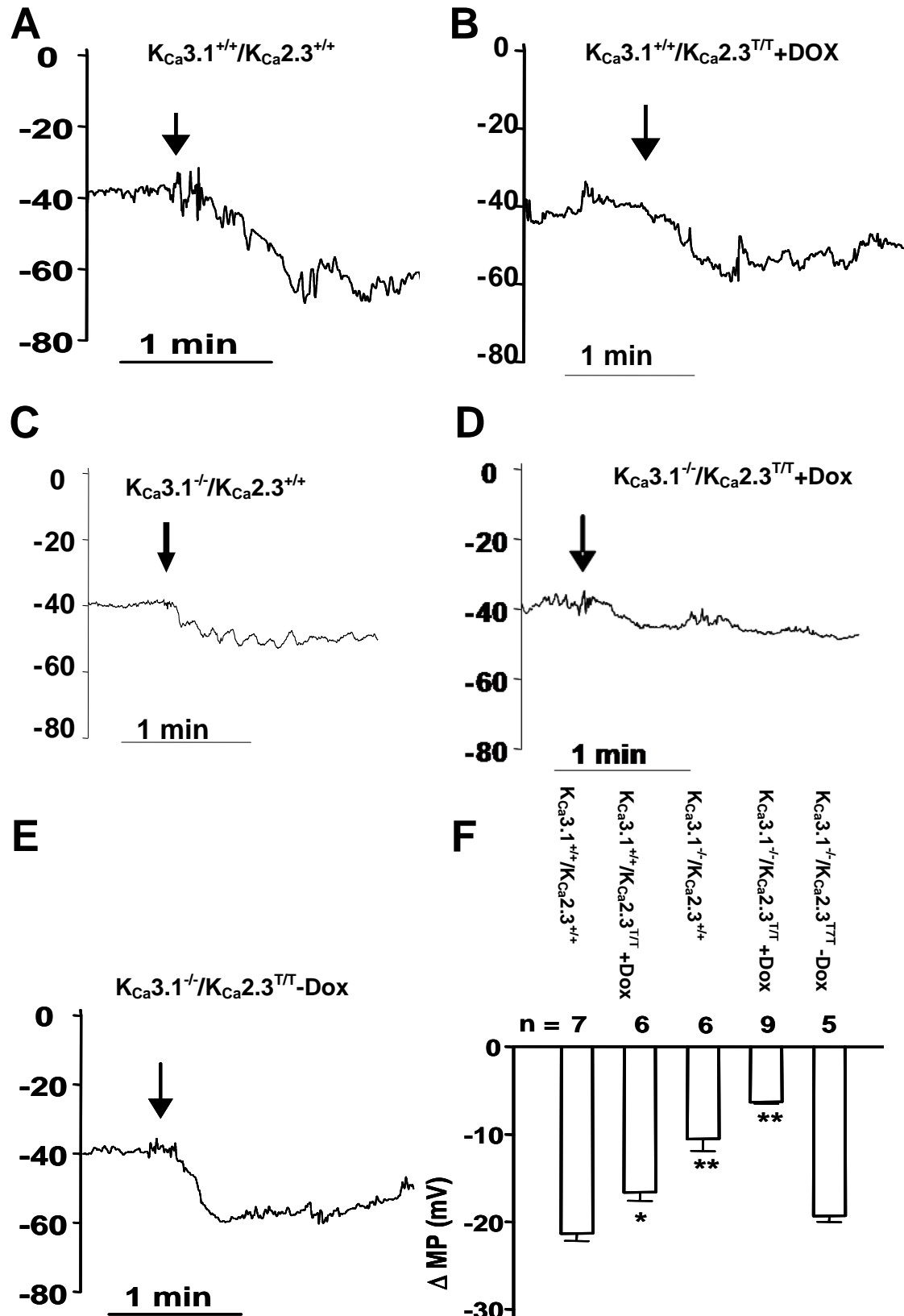


Abbildung 3.4: Sharp-Electrode-Messung des Membranpotenzials der glatten Gefäßmuskelnzellen nach Stimulation der vorkontrahierten A.c.c. mit intravasalem Acetylcholin (100 nmol/l): **A-E:** repräsentative Aufzeichnung des Membranpotenzials (in mV) von glatten Gefäßmuskelnzellen vor und nach Acetylcholingabe (Pfeil) **F:** Statistische Zusammenfassung der Membranpotenzialänderungen (ΔMP) in glatten Gefäßmuskelnzellen. Datenpunkte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben, n = Anzahl der Experimente für die verschiedenen Genotypen, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{+/+}$.

3.4 UNTERSUCHUNG DER FUNKTION VON $K_{Ca2.3}$ UND $K_{Ca3.1}$ BEI DER ENDOTHELVERMITTELTEN VASODILATATION

Nach der Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen wurde die Funktion der beiden Ca^{2+} -aktivierten Ionenkanäle bei der endothelvermittelten Vasodilatation der Arterien mittels eines Druckmyographen untersucht. Nach Vorkontraktion mit Phenylephrin wurde die azetylcholininduzierte Vasodilatation aufgezeichnet und als Prozentwert der maximalen Dilatation des Gefäßes angegeben. Dieser Referenzwert der maximalen Vasodilatation wurde durch die Gabe von Nitroprussid-Natrium (SNP, 10 μ mol/L) in die Badlösung erzielt. Die Zugabe von L-NNA (300 μ mol/L) und Indomethazin (10 μ mol/L) zur Unterdrückung der NO und Prostazyklinsynthese bei einem Teil der Experimente machte es möglich, die EDHF-Antwort auf verschiedene Stimuli isoliert zu betrachten.

3.4.1 VASODILATATION DURCH AZETYLCHOLIN

Azetylcholin bindet an endotheliale M-Rezeptoren und es kommt über G-Proteingekoppelte Signaltransduktionsmechanismen zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum und auch zu einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum, der möglicherweise über TRPC-Kanäle erfolgt (Nilius, Droogmans 2001). Diese Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration führt zu einer Aktivierung von K_{Ca} -Kanälen. Um die Bedeutung der $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ für die azetylcholininduzierte Vasodilatation zu untersuchen, wurde die Arteria carotis communis mit ansteigenden Azetylcholin-Konzentrationen (1 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 1 μ mol/L und 10 μ mol/L) perfundiert. Abbildung 3.5 zeigt repräsentative Myographenaufzeichnungen für verschiedene untersuchte Genotypen.

Abbildung 3.6 zeigt die Ergebnisse der Experimente mit LNNA und Indomethazin, d.h. die reine EDHF-Antwort auf den Acetylcholin-Stimulus. Die Perfusion mit Azetylcholin (100 nM) führte zu einer starken Vasodilatation der A.c.c. von Wildtypmäusen ($K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{+/+}$). Im Gegensatz dazu war die EDHF-vermittelte Antwort auf Azetylcholin bei Gefäßen von $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{+/+}$ -Tieren um ca. 75% vermindert ($p < 0,001$). Gefäße von $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Tieren mit vorheriger Doxyzyklinbehandlung zeigten keine Vasodilatation bei 100 nM ACh (Reduktion von ca. 99%, $p < 0,001$, **Abb. 3.6a**). Bei $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Tieren wies die EDHF-vermittelte Vasodilatation bei einer Konzentration von 100 nM ACh keine signifikante Veränderung der EDHF-vermittelten Vasodilatation im Vergleich zur Wildtypgruppe

auf, unabhängig davon, ob die Tiere vorher mit Doxozyklin behandelt wurden oder nicht (siehe **Abb. 3.6b**). Allerdings war die Vasodilatation auf 100 nM ACh bei Mäusen ohne $K_{Ca3.1}$ und mit gleichzeitiger Überexpression von $K_{Ca2.3}$ ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ ohne Dox) im Vergleich zu Wildtypgefäßen intakt.

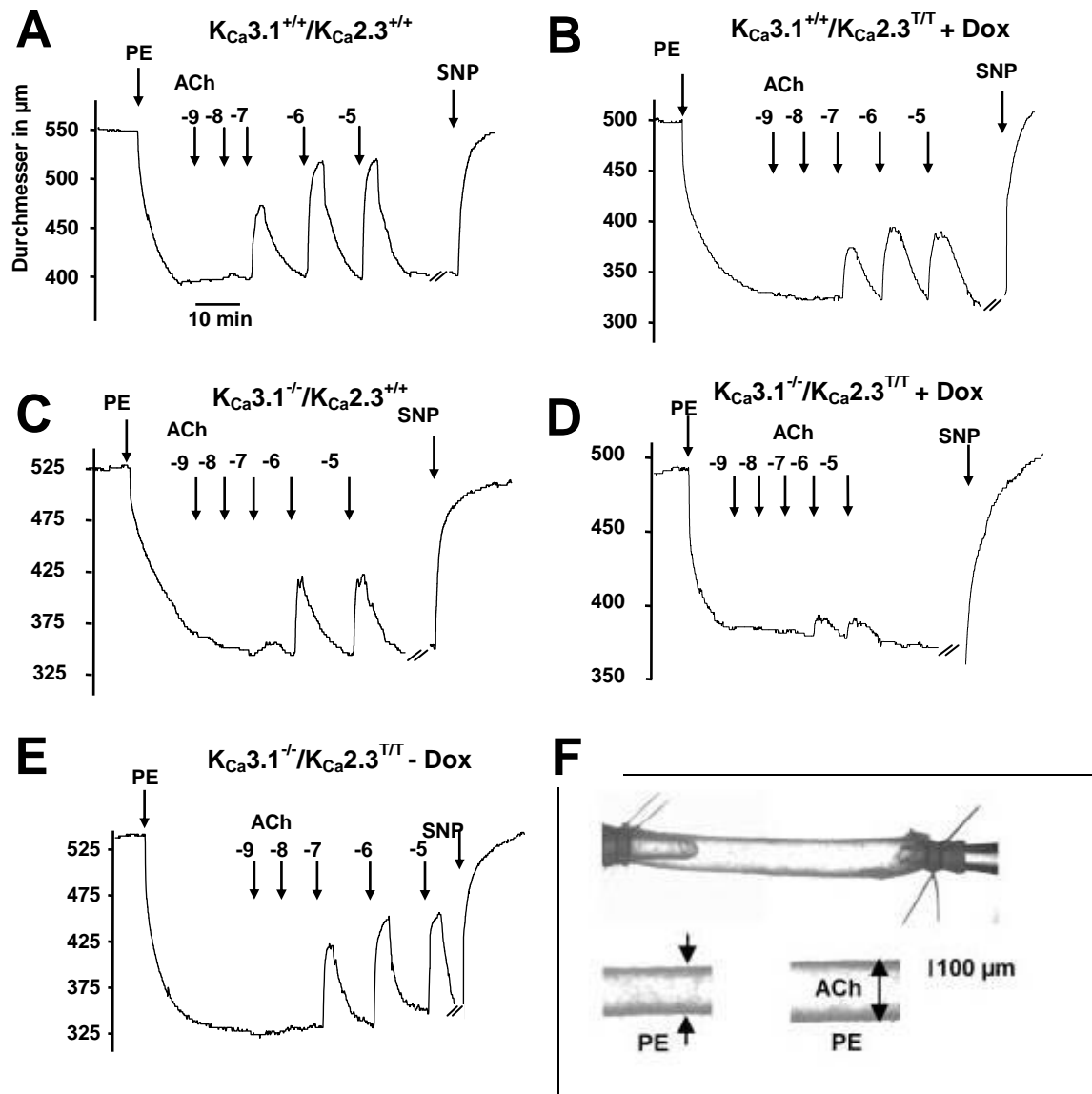


Abbildung 3.5: Originalaufzeichnungen von Myographenuntersuchungen an mit Phenylephrin (PE, 1 $\mu mol/L$) vorkontrahierten A.c.c. Zu sehen sind Erhöhungen des Gefäßdurchmesser (in μm) als Antwort auf ansteigende ACh-Konzentrationen (EDHF-medierte Vasodilationen, die Zahlen geben die Konzentration als log M ACh an), Pfeile zeigen den Beginn des jeweiligen ACh-Stimulus (je 3 Minuten). Außerdem ist die Vasodilatation nach Gabe von Nitroprussidnatrium (SNP) dargestellt, welche als Referenzwert verwendet wurde. Abbildung F zeigt exemplarisch das Bild eines Gefäßes im Experimentierbad. Zu sehen sind die Glaskapillaren, die als Zu- und Ablauf dienen und die mit Knoten befestigte A.c.c. Außerdem dargestellt ist die Dilatation des mit Phenylephrin (PE) vorkontrahierten Gefäßes durch intravasale Stimulation mit Azetylcholin (ACh).

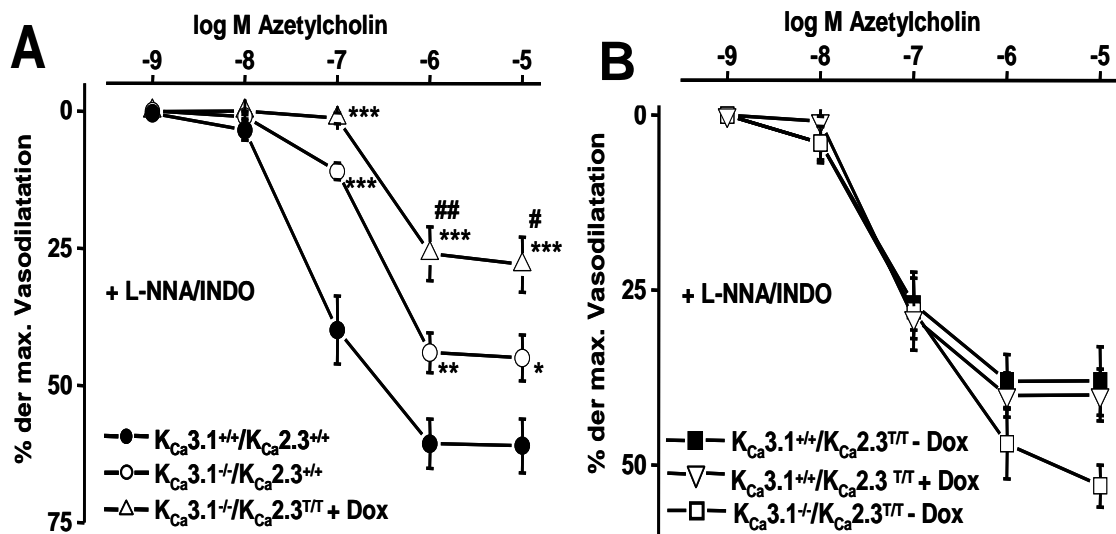


Abbildung 3.6: ACh-induzierte EDHF-vermittelte Vasodilatation (in Anwesenheit von 300 $\mu\text{mol/L}$ L-NNA und 10 $\mu\text{mol/L}$ Indomethazin) **A** in A.c.c. von Wildtypmäußen ($K_{\text{Ca}3.1}^{+/+}/K_{\text{Ca}2.3}^{+/+}$), $K_{\text{Ca}3.1}$ -Knockoutmäusen ($K_{\text{Ca}3.1}^{-/-}/K_{\text{Ca}2.3}^{+/+}$) und Dox-behandelten $K_{\text{Ca}3.1}^{-/-}/K_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ -Mäusen, (n=7 bis 8). **B** bei $K_{\text{Ca}3.1}^{+/+}/K_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ + Dox (n=9), $K_{\text{Ca}3.1}^{+/+}/K_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ - Dox (n=6), $K_{\text{Ca}3.1}^{-/-}/K_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ - Dox (n=5). Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardfehler. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Wildtyp. # $p < 0,05$, ## $p < 0,05$ vs. $K_{\text{Ca}3.1}^{-/-}/K_{\text{Ca}2.3}^{+/+}$; one-way ANOVA gefolgt durch Newman-Keuls post hoc Test.

Um die kombinierte NO- und EDHF-vermittelte endothelabhängige Vasodilatation zu untersuchen, wurde in einer zweiten Reihe von Experimenten die ACh-abhängige Vasodilatation ohne Blockade der NO- und Prostazyklinsynthese durch L-NNA und Indomethazin getestet (siehe **Abb. 3.7**). Als Referenzgruppe dienten wiederum Wildtypmäuße, die bei einer ACh-Konzentration von 100 nM gegenüber den Experimenten mit L-NNA/Indomethazin eine ca. 1,5fach stärkere Vasodilatation aufwiesen. Bei intakter NO-Synthese zeigte sich sowohl bei $K_{\text{Ca}3.1}^{-/-}/K_{\text{Ca}2.3}^{+/+}$ -Tieren als auch bei $K_{\text{Ca}3.1}^{-/-}/K_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ mit Doxyzyklinbehandlung jeweils eine Reduktion der EDHF-vermittelten Vasodilatation bei 100 nM ACh von ca. 30% ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Bemerkenswerterweise führte der gleichzeitige Verlust von $K_{\text{Ca}3.1}$ und $K_{\text{Ca}2.3}$ auch bei einer niedrigeren Konzentration von 10nM ACh zu einer signifikanten Reduktion, welche bei $K_{\text{Ca}3.1}^{-/-}/K_{\text{Ca}2.3}^{+/+}$ -Tieren nicht zu beobachten war. Bei Gefäßen von Tieren, bei denen nur die Expression des $K_{\text{Ca}2.3}$ -Kanals supprimiert wurde ($K_{\text{Ca}3.1}^{+/+}/K_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ + Dox), zeigte sich in diesem Konzentrationsbereich ebenfalls eine geringere Vasodilatation als bei der Wildtypgruppe ($p < 0,05$). In den Gruppen der $K_{\text{Ca}3.1}^{+/+}/K_{\text{Ca}2.3}^{-/-}$ - und $K_{\text{Ca}3.1}^{-/-}/K_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ -Tiere, die nicht mit Doxyzyklin behandelt wurden, ergab sich eine intakte Vasodilatation wie bei Wildtypmäußen.

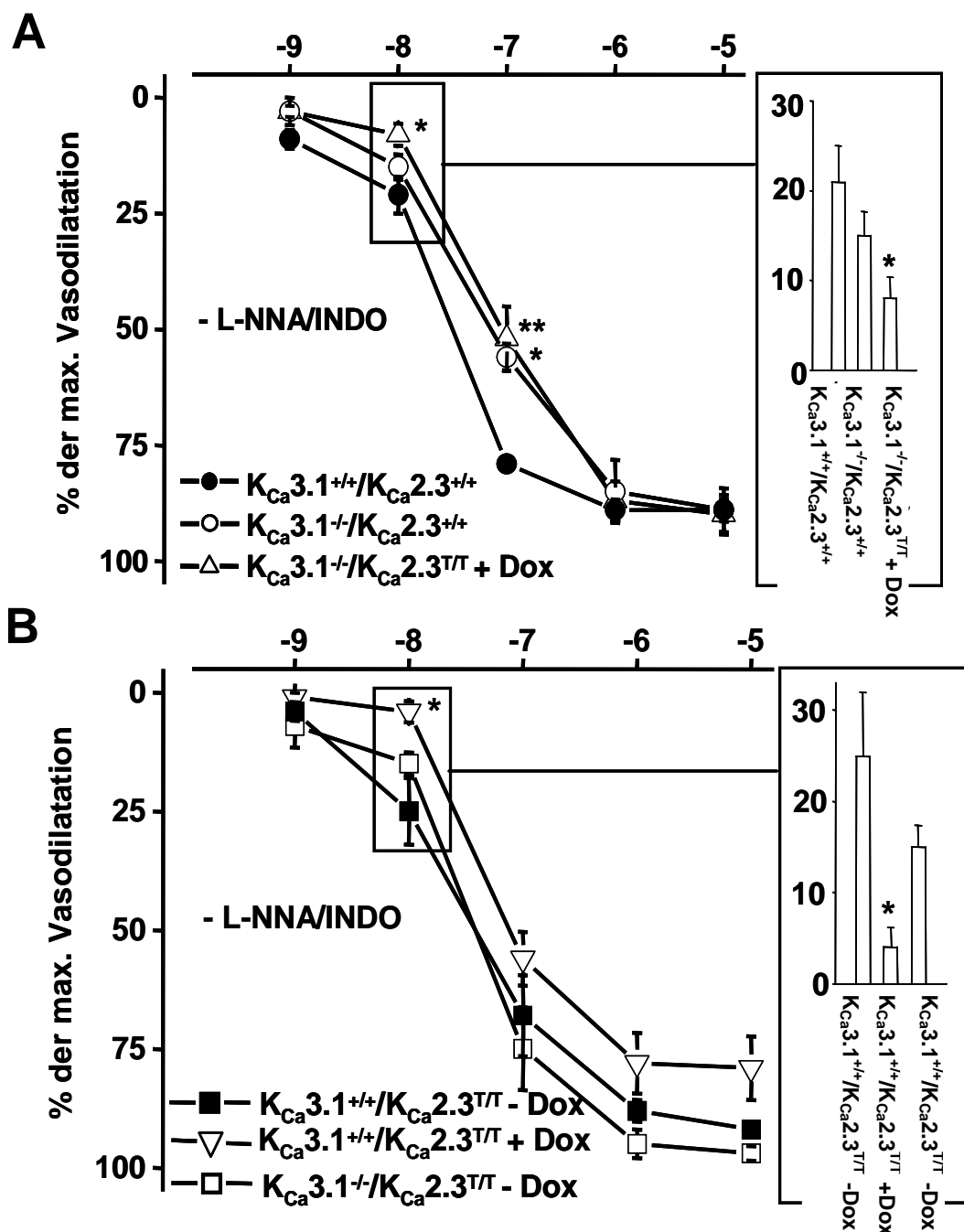


Abbildung 3.7: ACh-induzierte Vasodilatation in Anwesenheit von NO und Prostazyklin (ohne L-NNA und Indomethazin).

A: $K_{Ca}3.1^{+/+}/K_{Ca}2.3^{+/+}$, $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{+/+}$, $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T} + \text{Dox}$, (n=5 je Gruppe)

B: $K_{Ca}3.1^{+/+}/K_{Ca}2.3^{T/T} - \text{Dox}$, $K_{Ca}3.1^{+/+}/K_{Ca}2.3^{T/T} + \text{Dox}$, $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T} - \text{Dox}$ (je n=5). An der rechten Seite jeweils die Datenpunkte zu der Vasodilatation auf 10 nM ACh zur Verdeutlichung auch als Balkendiagramme dargestellt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. * $p < 0,05$ vs. $K_{Ca}3.1^{+/+}/K_{Ca}2.3^{+/+}$, ** $p < 0,01$, one-way ANOVA gefolgt durch Newman-Keuls post hoc test.

3.4.2 FLUSSINDUZIERTE VASODILATATION

Die Wandschubspannung (auch visköser Zug und im Englischen *shear stress* genannt), die das strömende Blut auf die Gefäßwand ausübt, ist eine wichtige hämodynamische Kraft und natürlicher physiologischer Stimulus, der eine Adaptation der Gefäßweite auslöst und damit zur adäquaten Einstellung der Organperfusion beiträgt. Bei einer Erhöhung der Wandschubspannung wird häufig eine Vasodilatation erzeugt, die endothelabhängig ist. Es wurde ebenfalls berichtet, dass hier Ionenkanäle eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen (Hartmannsgruber, Heyken et al. 2007). Die Rolle, die $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ hierbei spielen, ist bislang unklar. In den vorliegenden Druckmyographenexperimenten wurde die Wandschubspannung durch eine Erhöhung der Viskosität des Perfusates mit 5% Dextran erhöht und die Vasodilatation der A.c.c. der jeweiligen Genotypen bestimmt.

Zunächst wurden die Experimente in Anwesenheit von L-NNA und Indomethazin durchgeführt (**Abb. 3.8 A**). In Wildtyp-Arterien ($K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{+/+}$) betrug die flussinduzierte Vasodilatation 14% (n=7). Die Suppression des $K_{Ca2.3}$ -Kanals ($K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{T/T} + DOX$) führte zu einer signifikanten Reduktion der flussinduzierten Vasodilatation auf 2% (n=9, $p < 0,01$ gegenüber Wildtyptieren). Waren beide Kanalproteine nicht vorhanden ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T} + Dox$), war die Vasodilatation gegenüber den Wildtypgefäßen ebenfalls signifikant auf 5% (n=8, $p < 0,05$ gegenüber Wildtyp) gesenkt; dies brachte jedoch keine weitere Reduktion gegenüber der alleinigen $K_{Ca2.3}$ -Suppression. Im Gegensatz dazu führte der $K_{Ca3.1}$ -Knockout ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{+/+}$) zu keiner signifikanten Veränderung der Vasodilatation auf eine erhöhte Wandschubspannung. Gefäße mit einer Überexpression von $K_{Ca2.3}$ zeigten sowohl bei Anwesenheit von $K_{Ca3.1}$ ($K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca3.1}^{T/T} - DOX$) als auch in Abwesenheit dieses Kanals ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca3.1}^{T/T} - DOX$) keine signifikante Änderung (11% bzw. 18% Vasodilatation) gegenüber den Wildtypgefäßen. Analoge Experimente wurden ohne L-NNA und Indomethazin, d.h. bei intakter NO- und Prostazyklinsynthese, durchgeführt, um die kombinierte NO-, Prostazyklin- und EDHF-vermittelte Vasodilatation und eine mögliche Kompensation des Verlustes der Kaliumkanäle durch NO oder Prostazyklin untersuchen zu können (**Abb. 3.8 B**). Gerade NO spielt wohl bei dieser Form der Vasodilatation eine wichtige Rolle (Hartmannsgruber, Heyken, et al. 2008). Hierbei zeigten Wildtyptiere in Anwesenheit von NO eine stärkere flussinduzierte Vasodilatation als bei den Wildtyptieren mit inhibierter NO-Synthese. Wiederum waren diese bei doxyzyklinbehandelten $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca3.1}^{T/T}$ - und $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca3.1}^{T/T}$ -Mäusen stark vermindert, während die Vasodilatation bei $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca3.1}^{+/+}$ -Mäusen und nicht behandelten $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca3.1}^{T/T}$ - und $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca3.1}^{T/T}$ -Mäusen intakt waren.

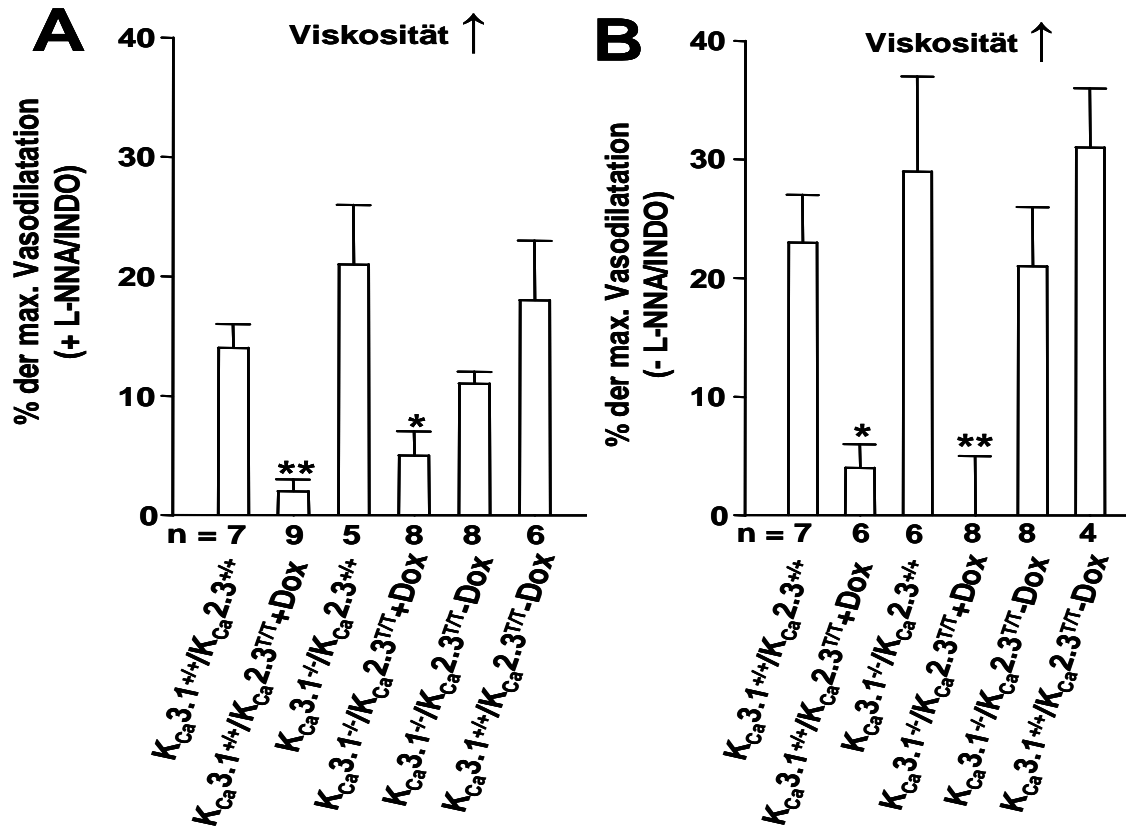


Abbildung 3.8: Untersuchung der funktionellen Bedeutung von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ bei der durch erhöhte Wandschubspannung-induzierten Vasodilatation (Dextranlösung 5% intravasal) an vorkontrahierten A.c.c. im Druckmyographen. **A** zeigt Experimente mit L-NNA/Indomethazin, **B** zeigt Experimente ohne LNNA/Indomethazin, d.h. in Anwesenheit von NO und Prostazyklin. n = Zahl der Experimente pro Versuchsgruppe. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{+/+}$ (Wildtyp), one-way ANOVA gefolgt durch Newman-Keuls post hoc Test.

Die flussinduzierte Vasodilatation wurde ebenfalls durch eine rasche Erhöhung der Durchflussgeschwindigkeit (von 30 auf 600 μ l/min) untersucht. Dazu wurde die Druckdifferenz ΔP zwischen Zu- und Ablauf des Myographen innerhalb von 5 s von ΔP 0 mmHg auf ΔP 20 mmHg erhöht (siehe **Abb 3.9**).

Die so erhaltenen Werte für die Vasodilatation stimmten mit den Ergebnissen aus den Dextran-Experimenten überein: Wildtypgefäße zeigten eine deutliche Vasodilatation von 11% (n=8). Gefäße, bei denen nur die Expression von $K_{Ca2.3}$ unterdrückt wurde ($K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca3.1}^{T/T} - DOX$), wiesen wiederum eine signifikante Reduktion ($p < 0,01$, n=12) der Vasodilatation gegenüber der Wildtypgruppe auf. Ebenfalls signifikant reduziert ($p < 0,01$, n=11) waren die Werte bei Gefäßen ohne Expression von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca3.1}^{T/T} + Dox$), wobei kein signifikanter Unterschied zur alleinigen $K_{Ca2.3}$ -Suppression zu beobachten war. Bei $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{+/+}$ - Gefäßen und bei Gefäßen mit $K_{Ca2.3}$ -Überexpression ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca3.1}^{T/T}$ - und $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca3.1}^{T/T}$ - Tiere ohne Dox) zeigte sich wiederum eine intakte flussinduzierte

Vasodilatation, die keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe aufwies. In Abwesenheit von L-NNA und Indomethazin waren die Vasodilatationen insgesamt stärker, eine signifikante Reduktion der Vasodilatation konnte jedoch nur bei Gefäßen mit unterdrückter $K_{Ca2.3}$ -Expression ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca3.1}^{T/T}$ - und $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca3.1}^{T/T}$ - Tieren mit Doxyzyklinbehandlung) beobachtet werden.

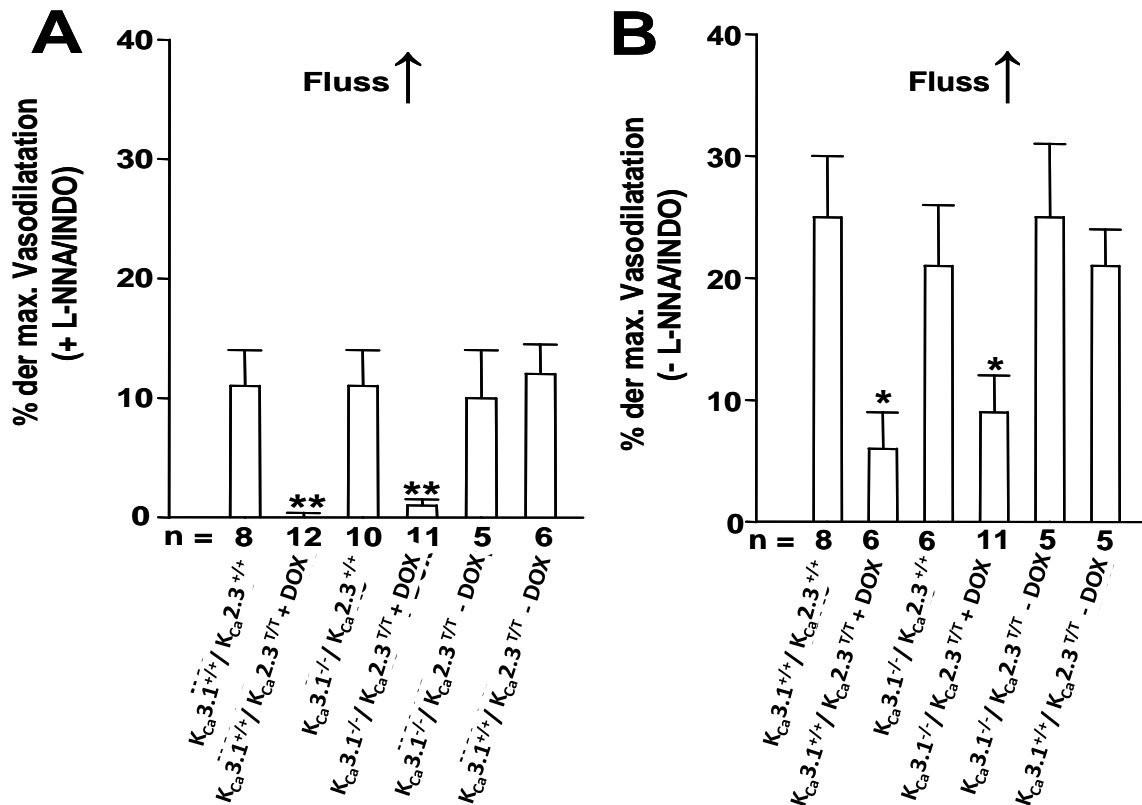


Abbildung 3.9: Untersuchung der funktionellen Bedeutung von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ bei der flussinduzierten Vasodilatation durch Erhöhung der Flussgeschwindigkeit an vorkontrahierten A.c.c. im Druckmyographen. **A** zeigt Experimente mit LNNA/Indomethazin, **B** zeigt Experimente ohne LNNA/Indomethazin. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{+/+}$, n = Zahl der Experimente pro Versuchsgruppe an. One-way ANOVA gefolgt von Newman-Keuls post-hoc Test.

3.5 BLUTDRUCKMESSUNG

Aufgrund der funktionellen Bedeutung von $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ für die Endothelfunktion und Gefäßtonusregulation sollte die Bedeutung dieser Ionenkanäle auch für die systemische Kreislaufregulation untersucht werden. Nachdem sich bereits am Myographen eine deutliche Veränderung der endothelvermittelten Vasodilatation durch die Unterdrückung der Kanalexpression gezeigt hatte, stellte sich die Frage, ob das Fehlen der beiden Ionenkanäle und die damit einhergehende endotheliale Dysfunktion auch zu einem erhöhten Blutdruck führte, zumal auf der systemischen Ebene zahlreiche andere Regulations- und Kompensationsmechanismen wirksam sind. Zu diesem Zweck wurde der Blutdruck telemetrisch gemessen (**siehe Abb. 3.10**).

Bei dieser invasiven Methode wird der Blutdruck durch eine operativ eingebrachte Sender-Einheit gemessen und über einen Empfänger aufgezeichnet. Hierbei wird ein Drucksensor in den Aortenbogen vorgeschoben. Die Implantation der Sender wurde freundlicherweise von Dr. Christoph Busch (Klinik für Innere Medizin – Nephrologie, Universitätsklinikum Marburg) durchgeführt. Nach einer postoperativen Erholungszeit von sieben Tagen erlaubt diese Telemetrie die kontinuierliche Aufzeichnung des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) sowie weiterer Kreislaufparameter wie der Pulsfrequenz über mehrere Tage oder Wochen.

Wildtypiere ($n=8$) hatten einen MAP von 100 ± 1 mmHg, der durch Gabe von Doxyzyklin über das Trinkwasser (2 mg/ml in 2% Sucroslösung) nicht beeinflusst wurde (99 ± 2 mmHg, $n=5$). Unbehandelte $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Tiere ($n=5$) zeigten einen vergleichbaren MAP von 102 ± 1 mmHg, während Tiere des gleichen Genotyps, die mit Doxyzyklin behandelt wurden ($K_{Ca2.3}$ -Suppression, $n=6$), einen signifikant erhöhten Blutdruck von 106 ± 1 mmHg aufwiesen ($p<0,01$ gegenüber Wildtypieren, $p<0,05$ gegenüber nicht behandelten $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Tieren). Bei $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{+/+}$ -Tieren zeigte sich ein vergleichbar erhöhter Blutdruck von 108 ± 1 mmHg ($p<0,01$ gegenüber Wildtypieren, $n=6$), der nach Doxyzyklinbehandlung keine Veränderungen zeigte (107 ± 1 , $n=3$).

Fehlten beide Ionenkanäle ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ + Dox, $n=9$), zeigten sich mit 110 ± 1 mmHg die höchsten MAP-Werte aller Versuchsgruppen ($p<0,001$ bzw. $p<0,05$ gegenüber Wildtypen bzw. $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ + Dox), dieser höhere Wert war jedoch gegenüber $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}$ -Tieren nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,15$). Entzog man diesen Tieren nun Doxyzyklin über zwei Wochen, so sank der MAP signifikant auf 105 ± 1 mmHg ($n=5$, $p<0,05$ gegenüber $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ + Dox), dieser Wert war

jedoch immer noch signifikant höher als bei Wildtypen ($p < 0,05$). Bei $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Tieren ($n=5$), die nicht mit Doxyzyklin behandelt wurden, zeigte sich ebenfalls ein niedrigerer Blutdruck als bei der mit Dox-behandelten Gruppe ($p < 0,05$), der aber ebenfalls höher als bei der Wildtypgruppe war ($P < 0,05$), **Abb. 3.10 A**).

Die ebenfalls kontinuierlich aufgezeichnete Herzfrequenz (siehe **Abb. 3.10 B**) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Untersuchung des Pulsdruckes (siehe **Abb. 3.10 C**) ergab auch annähernd gleiche Werte für Wildtyptiere und $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ mit Doxyzyklinbehandlung. Im Gegensatz dazu war der Pulsdruck bei den Genotypen $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{+/+}$ und $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ (mit und ohne Doxyzyklinbehandlung) signifikant höher als bei der Wildtypgruppe (jeweils $p < 0,01$).

Die Bewegungsaktivität der Tiere war bei doxyzyklinbehandelten $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ und Wildtypmäusen gleich und zeigte eine leichte, jedoch statistisch nicht signifikante, Zunahme bei $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{+/+}$ -Mäusen und bei mit Doxyzyklin behandelten $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Mäusen ($P=0,08$ bzw. $P=0,09$ gegenüber Wildtyptieren).

Die Auswertung des 24h-Profiles des Blutdruckes zeigte, dass die beobachtete Erhöhung des durchschnittlichen Blutdruckes bei $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{+/+}$ -Tieren und bei $K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ - und $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Tieren nach Doxyzyklinbehandlung vor allem durch einen höheren MAP-Wert in der Nachtperiode und während der Aktivitätsphasen zurückzuführen war (**Abb. 3.10 D, E**).

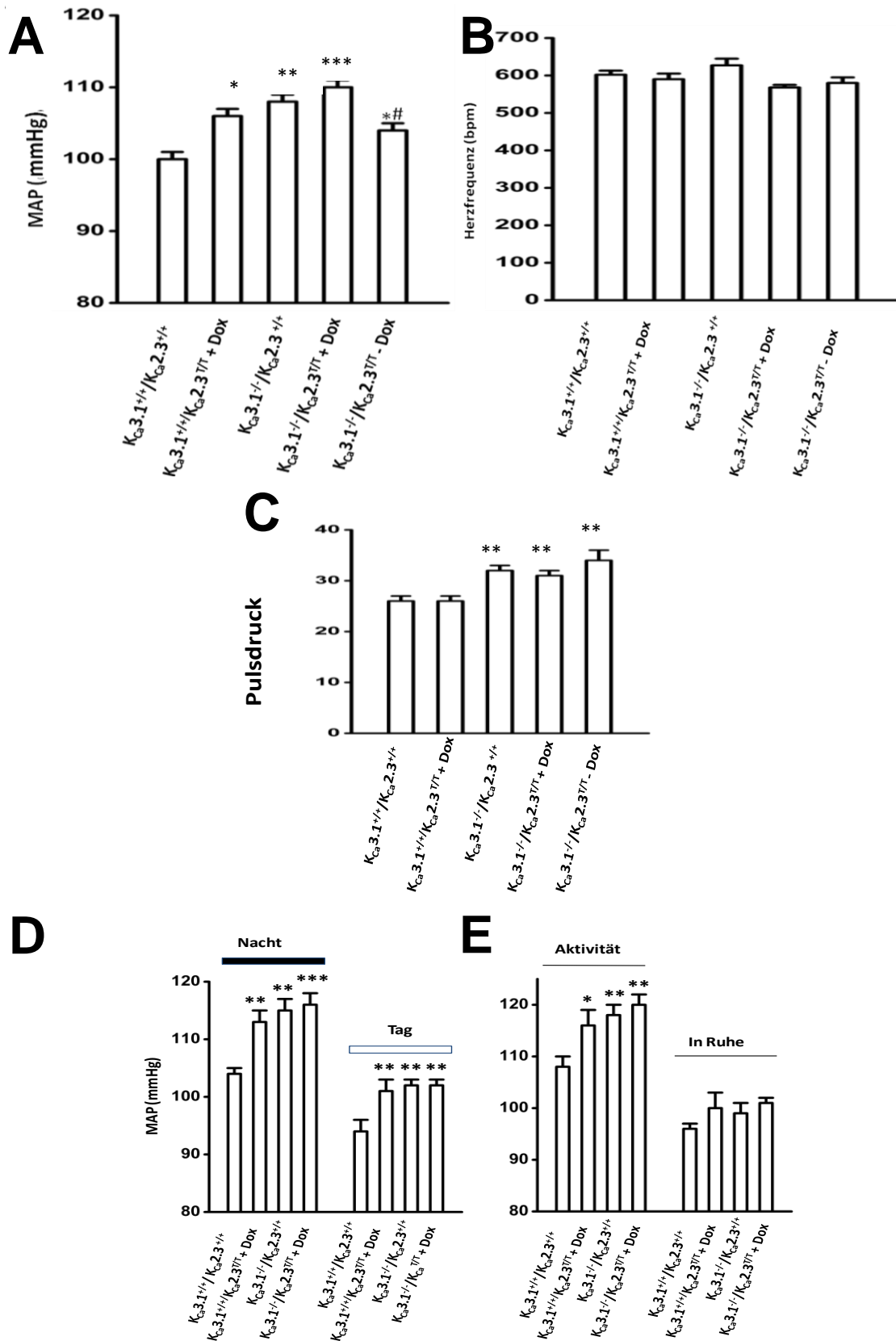


Abbildung 3.10: telemetrische Blutdruckmessung **A** telemetrische Messung (über 72 h) des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP), **B** Herzfrequenz in Schlägen pro Minute (bpm), **C** Pulsdruck in mmHg, **D** zirkadiane Veränderung des MAP am Tag und in der Nacht, **E** Veränderung des MAP bei Aktivität und in Ruhe. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. Wildtyp, # $P < 0.05$ vs. $K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T} + Dox$ in **A**; one-way ANOVA gefolgt durch Newman-Keuls post-hoc Test.

4 DISKUSSION

In den vorliegenden Experimenten sollte die funktionelle Bedeutung der Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ bei der endothelvermittelten Vasodilatation durch den sogenannten Endothelium-derived-hyperpolarizing-Factor (EDHF) untersucht werden. Der EDHF ist neben NO (Stickstoffmonoxid) und PGI_2 (Prostazyklin) der dritte wesentliche Faktor bei der endothelvermittelten Vasodilatation. Bislang wurden vor allem pharmakologische Methoden verwendet, um die Funktion von $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ zu untersuchen, während ein genetisches Modell für beide Ionenkanäle bislang nicht existierte. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit erstmals ein Mausmodell erzeugt und untersucht werden, bei dem die Expression beider Kanäle durch genetische Manipulation blockiert werden kann. Dabei handelt es sich um die Kombination eines konventionellen Knockouts von $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und eines induzierbaren Knockouts, bei dem das Antibiotikum Doxzyzyklin an einer eingefügten regulatorischen Kasette im $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ -Gen wirkt.

Dieses Modell ermöglichte es erstmals die Auswirkungen des Verlustes beider Ionenkanäle auf die zelluläre Hyperpolarisation, die endothelvermittelte Vasodilatation und die Regulation des Blutdrucks in vivo zu untersuchen.

4.1 GENERIERUNG DER VERSUCHSTIERE

Um dieses Modell zu züchten, wurden $\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{-/-}$ -Mäuse (Si, Heyken et al. 2006) mit $\text{K}_{\text{Ca}2.3}^{\text{T/T}}$ -Mäusen (Bond, Sprengel et al. 2000) gekreuzt. Während des Zuchtprozesses zeigten sich keine erkennbaren Veränderungen im Phänotyp und Verhalten der Tiere, so dass die genetischen Veränderungen wohl keinen Einfluss hierauf hatten. Die von Bond et al. beschriebenen Probleme der Muttertiere beim Geburtsvorgang durch die $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ -Überexpression konnten durch die perinatale Gabe von Doxzyzyklin erfolgreich vermieden werden (Bond, Sprengel et al. 2000). Die Gene verteilten sich erwartungsgemäß entsprechend den Mendelschen Regeln, so dass die gewünschten Genotypen erzeugt werden konnten.

Zur Bestimmung des Genotyps der Versuchstiere wurde die PCR mit den im Methodenteil genannten Primern jeweils für $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ und $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ durchgeführt. Das verwendete PCR-Protokoll lieferte verlässliche Ergebnisse, die nach anschließender Gelelektrophorese eindeutig den verschiedenen Genotypen zugeordnet werden konnten.

Somit war eine zuverlässige Zuordnung der Tiere in die verschiedenen Versuchsgruppen möglich.

4.2 BEHANDLUNG MIT DOXYZYKLIN UND PROTEINNACHWEIS MITTELS WESTERN-BLOT

Während es sich bei $K_{Ca}3.1$ um einen konventionellen Knockout handelte, musste der $K_{Ca}2.3$ -Knockout bei Tieren mit dem $K_{Ca}2.3^{T/T}$ -Gen erst durch Gabe von Doxyzyklin über das Trinkwasser erzeugt werden. Ohne Doxyzyklin sollte der $K_{Ca}2.3$ -Kanal bei diesen Tieren stark überexprimiert sein. Die Tiere zeigten während der zweiwöchigen Doxyzyklinbehandlung keine erkennbaren Auffälligkeiten in Verhalten oder Phänotyp.

In unserem Labor wurden von Frau MSc Anuradha Kaistha Experimente mit der Western-Blot-Methode durchgeführt, um nachzuweisen, dass die vorgenommen genetischen Veränderungen der Versuchstiere auch zu den beabsichtigen Veränderungen der Expression der Kanalproteine führten. Insbesondere war es wichtig, die Wirksamkeit der Doxyzyklinbehandlung bei Tieren mit dem $K_{Ca}2.3^{T/T}$ -Gen zu überprüfen.

Bei Tieren mit dem Genotyp $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T}$, die mit Doxyzyklin behandelt wurden, war im Western-Blot eine Proteinexpression der beiden Ionenkanäle nicht mehr nachzuweisen. Tiere mit dem gleichen Genotyp, jedoch ohne vorherige Behandlung mit Doxyzyklin, zeigten eine deutlich stärkere Bande für $K_{Ca}2.3$ als bei Wildtyptieren, was die starke Überexpression des Kanals in Abwesenheit von Doxyzyklin zeigte. Während bei Wildtyptieren die Bande für $K_{Ca}2.3$ bei 81 kDa lag, befand sich die entsprechende Bande bei den $K_{Ca}2.3$ -überexprimierenden Mäusen bei 68 kDa. Diese Diskrepanz der Proteingröße ist auf die Verkürzung des $K_{Ca}2.3^T$ -Gens um 40 Aminosäuren zurückzuführen, was mit den Beobachtungen von Bond et al. übereinstimmt (Bond, Sprengel et al. 2000).

Diese Ergebnisse bestätigten, dass bei $K_{Ca}3.1^{-/-}/K_{Ca}2.3^{T/T}$ -Mäusen die beabsichtigte Blockade der Kanalexpression erreicht werden konnte, und dass mit Doxyzyklin eine wirksame Kontrolle der Kanalexpression bei $K_{Ca}2.3^{T/T}$ -Mäusen möglich war.

4.3 VERLUST VON $K_{Ca3.1}$ UND $K_{Ca2.3}$ FÜHRT ZUR SIGNIFIKANTEN REDUKTION DER ENDOTHELIALEN HYPERPOLARISATION

Als Nachweis, dass die Ausschaltung bzw. Überexpression der Kanalproteine zu einer Änderung der K_{Ca} -Ströme der Endothelzellen führte, dienten Patch-Clamp-Untersuchungen im Whole-Cell-Modus an frisch isolierten Endothelzellen aus der Arteria carotis communis (A.c.c.) der Versuchstiere. Frühere Publikationen konnten nachweisen, dass sowohl $K_{Ca2.3}$ als auch $K_{Ca3.1}$ in Endothelzellen exprimiert werden (Köhler, Hirschberg et al. 1996; Eichler, Wibawa et al. 2003; McNeish, Sandow et al. 2006). In den Patch-Clamp-Experimenten konnte bei Wildtypen Ca^{2+} -abhängige K^{+} -Auswärtsströme beobachtet werden, die nicht spannungssensitiv waren, eine leichte Einwärtsrektifizierung zeigten und zu einer Hyperpolarisation führten. Somit wiesen die gemessenen Ströme die typischen Charakteristika von $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ auf (Köhler, Brakemeier et al. 2001; Burnham, Bychkov et al. 2002; Bychkov, Burnham et al. 2002). UCL1684 und TRAM34 werden als selektive Blocker der beiden Ionenkanäle angesehen (Eichler, Wibawa et al. 2003) und die Kombination beider Blocker in der Badlösung führte auch meinen Patch-Clamp Experimenten zu einer wirkungsvollen Blockade des Ca^{2+} -aktivierten K^{+} -Stromes.

Endothelzellen von Tieren, bei denen entweder der $K_{Ca2.3}$ -Kanal oder der $K_{Ca3.1}$ -Kanal fehlte, wiesen eine Halbierung des K_{Ca} -Stromes gegenüber Wildtypzellen auf, was zeigt, dass diese beiden Kanäle jeweils die Hälfte zum K_{Ca} -Gesamtstrom beitragen.

Bei einem Fehlen beider K_{Ca} -Kanäle ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T} + Dox$) war der K_{Ca} -Strom bis auf einen minimalen Reststrom nicht mehr nachweisbar. Dieser Reststrom war mit UCL1684 vollständig zu blockieren, was dafür spricht, dass es sich hierbei um die Aktivität einiger weniger verbleibender $K_{Ca2.3}$ -Kanäle handelte. Dies kam vermutlich dadurch zustande, dass die Doxyzyklinbehandlung zwar zu einer effektiven Blockade der Kanalexpression von $K_{Ca2.3}$ führte, jedoch einige wenige Kanalproteine dennoch in der Zellmembran über einen längeren Zeit verblieben oder in geringem Umfang noch transkribiert wurden. Dieser Reststrom bei $K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Mäusen mit Doxyzyklinbehandlung wurde ebenfalls von Taylor et al. beschrieben (Taylor, Bonev et al. 2003).

Bei Endothelzellen ohne Expression von $K_{Ca3.1}$, jedoch mit einer starken Überexpression von $K_{Ca2.3}$, wurde ein um den Faktor zehn gesteigerter und UCL 1684-sensitiver K_{Ca} -Strom nachgewiesen, was die starke Expressionsaktivität des $K_{Ca2.3}^T$ -Gens in Abwesenheit von Doxyzyklin zeigte.

Durch diese Ergebnisse konnte demnach nachgewiesen werden, dass in Endothelzellen der K_{Ca} -Strom durch die Ionenkanalaktivität von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ gebildet wird. Hierbei scheinen diese beiden Ionenkanäle jeweils ungefähr die Hälfte zum Gesamtstrom beizutragen. Die veränderte Kanalexpression im verwendeten Mausmodell führte zu den erwarteten elektrophysiologischen Funktionsveränderungen der Endothelzelle: einer nahezu vollständigen Reduktion des K_{Ca} -Stromes und damit zu einer deutlichen Verminderung der Fähigkeit zu Hyperpolarisation der Endothelzelle. Eine starke Überexpression des $K_{Ca2.3}$ -Kanals führte hingegen zu einem zehnfach gesteigerten K_{Ca} -Strom.

4.4 ENDOTHELIALE $K_{Ca3.1}$ UND $K_{Ca2.3}$ HABEN ENTSCHEIDENDEN EINFLUSS AUF DAS MEMBRANPOTENZIAL DER GEFÄßMUSKELZELLEN

Bei der Untersuchung der endothelvermittelten Vasodilatation durch EDHF steht insbesondere die funktionelle Interaktion zwischen Endothelzelle und glatter Gefäßmuskelzelle im Zentrum des Interesses. Das hyperpolarisierende EDHF-Signal entsteht, wie in den Patch-Clamp-Untersuchungen gezeigt, durch die gemeinsame $K_{Ca3.1}/K_{Ca2.3}$ -Kanalaktivität in den Endothelzellen und muss dann auf den Verband der Gefäßmuskelzelle übertragen werden, um eine Vasodilatation bewirken zu können. Deshalb sollte durch Membranpotenzialmessungen an glatten Gefäßmuskelzellen in situ (d.h. am intakten präparierten Gefäß) untersucht werden, ob die bereits beschriebenen funktionellen Veränderungen der Endothelzelle durch die veränderte Kanalexpression auch Einfluss auf das Membranpotenzial der glatten Gefäßmuskelzellen haben. Hierzu wurde die Veränderung des Membranpotenzials nach Gabe von Azetylcholin gemessen. Obwohl die beiden Ionenkanäle eine ähnliche Fähigkeit zur Erzeugung des K_{Ca} -Stromes in den Endothelzellen zeigten (siehe oben), scheinen sie dennoch einen unterschiedlichen Beitrag zur ACh-induzierten und EDHF-medierten Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen in den untersuchten Gefäßen zu leisten. Die Ergebnisse der Sharp-Electrode-Messungen sprechen hier für eine wichtigere Rolle von $K_{Ca3.1}$, da die Reduktion der Hyperpolarisation auf intravasale Gabe von Azetylcholin in Abwesenheit von $K_{Ca3.1}$ allein deutlich stärker reduziert war als bei alleiniger Abwesenheit von $K_{Ca2.3}$.

$K_{Ca2.3}$ scheint jedoch ebenfalls eine Rolle zu spielen, da das Fehlen von $K_{Ca2.3}$ allein ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion gegenüber der Wildtypgruppe führte und in

Abwesenheit beider Ionenkanäle eine noch stärkere Verminderung der Hyperpolarisation erzielt werden konnte. Eine Überexpression von $K_{Ca2.3}$ (und damit einer zehnfachen Verstärkung des endothelialen $K_{Ca2.3}$ -Stromes) bei gleichzeitiger Abwesenheit von $K_{Ca3.1}$ führte zu einer Wiederherstellung der ACh-induzierten Hyperpolarisation. Diese Hyperpolarisation übertraf die Hyperpolarisation bei Wildtyptieren jedoch nicht. Dies deutet also daraufhin, dass eine starke Überexpression des $K_{Ca2.3}$ zwar einen kompensatorischen Effekt bei Abwesenheit des $K_{Ca3.1}$ hat, aber die Hyperpolarisation per se nicht verstärken kann.

Diese Ergebnisse bestätigen somit die These, dass die Hyperpolarisation in der glatten Gefäßmuskulatur tatsächlich durch die endotheliale Aktivität von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ eingeleitet wird, wobei $K_{Ca3.1}$ die führende Rolle bei der Azetylcholin-induzierten Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur zu spielen scheint. Die Ergebnisse zeigen auch, dass eine direkte funktionelle Kopplung zwischen Endothel und glatter Gefäßmuskulatur bei der Vasodilatation besteht. Der genaue Mechanismus dieser Signaltransduktion ist allerdings noch nicht abschließend identifiziert und wurde in den Experimenten zu dieser Dissertation nicht untersucht. Bezüglich der Mechanismen werden mehrere Hypothesen wie eine elektrotonische Kopplung via Gap-Junctions, Epoxyeikosanoide und die durch K_{Ca} -Kanäle in den Interzellulärraum freigesetzten K^+ -Ionen selbst als Übertragungsmechanismus diskutiert (Feletou, Vanhoutte 2006). Eine Kombination aus diesen verschiedenen Systemen ist ebenfalls vorstellbar.

4.5 FUNKTION VON $K_{Ca2.3}$ UND $K_{Ca3.1}$ BEI DER VASODILATATION DURCH EDHF

Nach der Übertragung des EDHF-Signals auf die glatte Gefäßmuskulatur erfolgt eine Relaxation der Gefäßmuskelzellen und damit eine Vasodilatation des Gefäßes. Zur direkten Untersuchung dieses Effektes am Blutgefäß selbst wurden die Arteria carotis communis der Versuchstiere in Experimenten am Druckmyographen unter annähernd physiologischen Bedingungen untersucht. Hierbei wurden die Experimente, sowohl in Anwesenheit von L-NNA und Indomethazin zur Untersuchung der reinen EDHF-Antwort, als auch ohne diese beiden Substanzen zur Bestimmung der gesamten endothelvermittelten Vasodilatation (d.h. inklusive NO und PGI_2), ausgeführt. Als physiologischer Stimulus der EDHF-Antwort diente Azetylcholin.

Bei Experimenten in Anwesenheit von Indomethazin und L-NNA, d.h. unter Ausschaltung der Synthese von NO und PGI₂, konnte bei Wildtypgefäßen konzentrationsabhängig eine EDHF-vermittelte Vasodilatation erzeugt werden. In Gefäßen, bei denen nur der K_{Ca}3.1-Kanal fehlte, war die ACh-stimulierte Vasodilatation bei den Konzentrationen 10⁻⁷, 10⁻⁶ und 10⁻⁵ mol/L ACh signifikant gegenüber der Wildtypgruppe vermindert. Dieser Effekt war bei 10⁻⁷ mol/L ACh besonders deutlich ausgeprägt (Reduktion um ca. 75%). Bei Gefäßen, in denen zusätzlich noch der K_{Ca}2.3-Kanal fehlte, war diese Reduktion noch deutlicher. Hier war bei einer Konzentration von 10⁻⁷ mol/L ACh die endothelvermittelte Vasodilatation praktisch nicht mehr nachweisbar (Reduktion von ca. 99%). Im Gegensatz zu den K_{Ca}3.1^{-/-}-Mäusen zeigten Tiere, bei denen nur K_{Ca}2.3 nicht vorhanden war (K_{Ca}3.1^{+/+}/K_{Ca}2.3^{T/T} + Dox), keine signifikante Reduktion der EDHF-vermittelten Vasodilatation. Eine Überexpression von K_{Ca}2.3 bei diesen Mäusen (d.h. ohne Doxyzyklinbehandlung) führte auch zu keiner Verstärkung der Vasodilatation. Ähnlich der Ergebnisse zur Membranpotenzialmessungen an der glatten Gefäßmuskulatur, sprechen diese Ergebnisse erneut für eine dominierende Rolle von K_{Ca}3.1 bei der ACh-induzierten, EDHF-medierten Vasodilatation. Eine Überexpression von K_{Ca}2.3 bei gleichzeitigem K_{Ca}3.1-Knockout führte zu einer Verstärkung der Vasodilatation, allerdings war diese Vasodilatation niedriger als die Werte der Wildtypgruppe. Der Effekt der Überexpression von K_{Ca}2.3 wird somit vermutlich erst dann relevant, wenn K_{Ca}3.1 nicht vorhanden ist, was ein Hinweis auf eine mögliche kompensatorische Funktion von K_{Ca}2.3 sein könnte.

Untersuchungen an Widerstandsgefäßen des M. cremasters der Mäuse, die unter der Leitung von Prof. Dr. Cor deWit an der Universität Lübeck durchgeführt wurden, zeigten sehr ähnliche Ergebnisse und bestätigten die Aussage aus den Experimenten an der A. carotis communis. Außerdem lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass K_{Ca}3.1 und K_{Ca}2.3 nicht nur in größeren Gefäßen wie der A. carotis wesentlichen Anteil an der EDHF-Antwort haben, sondern auch eine ähnlich wichtige Rolle in den kleineren Arteriolen in vivo spielen, deren Kontraktionszustand den totalen peripheren Widerstand im Gefäßsystem bestimmt.

Insgesamt zeigen die Experimente mit Azetylcholin am Myographen, dass insbesondere K_{Ca}3.1 von entscheidender Bedeutung für die EDHF-Antwort durch Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (durch ACh) und der nachfolgenden Ca²⁺-Freisetzung ist. Die verschiedenen Rollen, die die beiden Kanäle spielen, könnte mit der in aktuellen

Veröffentlichungen postulierten unterschiedlichen Lokalisation der beiden Kanäle in der Zellmembran des Endothels zusammenhängen: $K_{Ca2.3}$ an endothelialen „tight junctions“ (Dora, Gallagher et al. 2008) und möglicherweise in Caveolae (Weston, Absi et al. 2005), und $K_{Ca3.1}$ an endothelialen Fortsätzen durch die Lamina elastica (also im Bereich von myoendothelialen Gap-Junctions (Dora, Gallagher et al. 2008) und in der Nähe des endoplasmatischen Retikulums (Ledoux, Taylor et al. 2008). Damit könnten kurzzeitige ACh-stimulierte Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem endoplasmatischen Retikulum, auch als „ Ca^{2+} -pulsars bezeichnet“ (Ledoux, Taylor et al. 2008), bevorzugt den $K_{Ca3.1}$ -Kanal aktivieren.

Der Beitrag von NO und Prostazyklin zur endothelabhängigen Vasodilatation ist vom Gefäßdurchmesser abhängig (Shimokawa, Yasutake et al. 1996; Eichler, Wibawa et al. 2003; Koeppen, Feil et al. 2004). In der A. carotis communis trägt NO erheblich zur ACh-induzierten Vasodilatation bei (Si, Heyken et al. 2006). Bei maximaler intravasaler ACh-Konzentration bei aktiver NO-Synthese blieb in den Experimenten ohne L-NNA und Indomethazin die Vasodilatation der Arterien trotz der Abwesenheit der K_{Ca} -Kanäle intakt. Allerdings waren bei niedrigeren ACh-Konzentrationen die EDHF-vermittelte Vasodilatation bei Gefäßen ohne $K_{Ca2.3}$ und bei Mäusen ohne $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$ trotz intakter NO-Synthese reduziert, während Gefäße, bei denen nur $K_{Ca3.1}$ fehlte, keine signifikante Reduktion bei niedrigen ACh-Konzentrationen zeigten. Dies lässt den Schluss zu, dass K_{Ca} -Kanäle, insbesondere $K_{Ca2.3}$, bei der NO Synthese eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu diesen Experimenten an der A. carotis communis zeigten die Untersuchungen in der Mikrozirkulation des M. cremaster einen deutlichen Effekt durch die Suppression der beiden K_{Ca} -Kanäle bei intakter NO-Synthese, was die besondere Bedeutung des EDHF und die geringere Bedeutung von NO bei der Vasodilatation dieser Widerstandsgefäße zeigt. Inwiefern hier der einzelne Kanal an der NO-Synthese beteiligt sein könnte, kann aber nicht abschließend beurteilt werden.

Wie Untersuchungsergebnisse anderer Gruppen nahe legen, spielt EDHF neben NO ebenfalls eine wichtige Rolle bei der flussinduzierten Vasodilatation (Joannides, Haefeli et al. 1995). Dieses Phänomen konnte auch in menschlichen Gefäßen nachgewiesen werden (Bellien, Iacob et al. 2006, Pohl, Holtz et al. 1986). Während einige der bisherigen Arbeiten zur endothelvermittelten flussinduzierten Vasodilatation vermuten, dass die NO-unabhängige flussinduzierte Vasodilatation über die Cytochrom P450 abhängige Bildung von EETS (Huang, Sun et al. 2005) zustande kommt, zeigen unsere

Ergebnisse, dass K_{Ca} -Kanäle in der A. carotis communis der Maus hierbei eine wichtige Rolle spielen.

Die Ergebnisse aus den Experimenten zur Untersuchung der Vasodilatation nach einer Erhöhung der Wandschubspannung, durch Erhöhung der Viskosität oder Erhöhung der Flussgeschwindigkeit liefern auch weitere Hinweise auf unterschiedliche Funktionen von $K_{Ca3.1}$ und $K_{Ca2.3}$: Mäuse ohne Expression des $K_{Ca2.3}$ -Kanals zeigten eine signifikante Reduktion der flussinduzierten Vasodilatation (sowohl bei Erhöhung der Viskosität, als auch bei Erhöhung der Flussgeschwindigkeit), während dieser Effekt bei einem alleinigen $K_{Ca3.1}$ -Knockout nicht zu beobachten war. Die Tatsache, dass dieser Effekt nicht nur bei unterdrückter NO-Synthese durch L-NNA, sondern ebenfalls bei intakter NO-Synthese nachzuweisen war, ist ein Hinweis darauf, dass $K_{Ca2.3}$ nicht nur über den EDHF-Mechanismus, sondern auch über die NO-Synthese eine wichtige Rolle bei der Reaktion des Gefäßes auf mechanische Stimulation, z.B. durch erhöhte Wandschubspannung spielt. Interessanterweise führt die Überexpression von $K_{Ca2.3}$ weder in An- noch in Abwesenheit von $K_{Ca3.1}$ zu einer weiteren Steigerung der flussinduzierten Vasodilatation. Möglicherweise ist bereits die normale Anzahl der Kanalproteine in der Zellmembran ausreichend, um bei diesem Stimulus eine maximale Vasodilatation auszulösen. Außerdem könnte durch diese Gefäßerweiterung der mechanische Stimulus selbst sehr schnell aufgehoben werden (deWit, Schäfer et al. 1997). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass vor allem $K_{Ca2.3}$ und nicht $K_{Ca3.1}$ eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion nach mechanischer Stimulation des Endothels durch eine erhöhte Wandschubspannung spielt und somit sowohl zu einer EDHF-, als auch zu einer NO-medierten Vasodilatation führt.

Da $K_{Ca2.3}$ selbst nicht mechanosensitiv ist, stellt sich die Frage wie die Aktivierung von $K_{Ca2.3}$ durch die erhöhte Wandschubspannung zustande kommt. Hierbei könnte der mechanosensitive Ca^{2+} -Kanal TRPV-4 die Funktion des Mechanosensors übernehmen, der zu einem Ca^{2+} -Einstrom führt und somit $K_{Ca2.3}$ aktiviert. Experimente an TRPV-4-Knockouttieren konnten zeigen, dass die flussinduzierte Vasodilatation in Abwesenheit von TRPV-4 signifikant verringert ist (Hartmannsgruber, Heyken et al. 2008). Als Erklärung für die selektive Aktivierung von $K_{Ca2.3}$ durch die erhöhte Wandschubspannung kommt eine Kolokalisation von TRPV-4 und $K_{Ca2.3}$ in Caveolae der Zellmembran in Betracht (Dessy, Bouzin et al. 2008).

4.6 DER VERLUST VON K_{Ca} -KANÄLEN FÜHRT ZU ERHÖHTEM SYSTEMISCHEN BLUTDRUCK

Nachdem eine zentrale Bedeutung der K_{Ca} -Kanäle bei der EDHF-vermittelten Vasodilatation nachgewiesen werden konnte, sollte geklärt werden, ob sich der Verlust dieser Kanäle auch auf den systemischen Blutdruck der Versuchstiere auswirkte. Dazu wurde der Blutdruck der Versuchstiere zusammen mit der Herzfrequenz kontinuierlich über mehrere Tage telemetrisch aufgezeichnet. Ein möglicher Nachteil der telemetrischen Untersuchung ist, dass es sich hierbei um ein invasives Verfahren handelt, bei dem den Mäusen zunächst ein Sender implantiert werden muss. Allerdings zeigten die Tiere nach einer siebentägigen postoperativen Erholungsphase keine erkennbaren Beeinträchtigungen oder Verhaltensauffälligkeiten und erlaubten somit valide Messungen. Der große Vorteil der Telemetrie ist, dass dieses Verfahren die kontinuierliche Aufzeichnung der Blutdruckwerte über 24 Stunden bei voller Bewegungsfreiheit erlaubt, anstatt nur punktuelle Messungen wie bei nicht-invasiven Verfahren zuzulassen.

Zunächst wurde als Referenzwert ein mittlerer arterieller Druck (MAP) von 100 ± 1 mmHg bei Wildtyptieren gemessen. Eine Doxyzyklingabe hatte hier keinen Effekt auf den Blutdruck, so dass eine Blutdruckveränderung als Nebenwirkung von Doxyzyklin unwahrscheinlich war.

Bei fehlender Expression des $K_{Ca2.3}$ -Kanals ($K_{Ca3.1}^{+/+}/K_{Ca2.3}^{T/T} + \text{Dox}$) zeigten die Versuchstiere signifikant erhöhte Blutdruckwerte auf 106 ± 1 mmHg und bei Fehlen von $K_{Ca3.1}$ eine Erhöhung auf 107 ± 1 mmHg, was für eine gleichberechtigte Beteiligung von $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ bei der Regulation des Blutdrucks durch endothelvermittelte Vasodilatation sprechen könnte. Waren beide Kanäle nicht vorhanden ($K_{Ca3.1}^{-/-}/K_{Ca2.3}^{T/T}$ -Tiere + Dox), zeigten sich die höchsten Blutdruckwerte aller Versuchsgruppen von 110 ± 1 mmHg. Dieser Wert war gegenüber den $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Tieren jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Der eher geringe additive Effekt durch den Verlust beider Ionenkanäle ist ein weiterer Beleg dafür, dass zwar beide Ionenkanäle eine essenzielle Rolle bei der Blutdruckregulation spielen, jedoch hierbei unterschiedliche Funktionen bei der Signaltransduktion verschiedener Stimuli übernehmen. Diese Hypothese wird außerdem von der Beobachtung gestützt, dass eine Überexpression von $K_{Ca2.3}$ nicht in der Lage ist, einen gleichzeitigen Verlust von $K_{Ca3.1}$ vollständig zu kompensieren.

Insgesamt passt dieser Befund aus den in-vivo-Messungen gut zu den Ergebnissen aus den Myographenexperimenten, die ebenfalls für unterschiedliche funktionelle Rollen der beiden Ionenkanäle bei der EDHF-vermittelten Vasodilatation sprechen.

Interessanterweise war der Pulsdruck der Tiere ausschließlich bei Mäusen ohne $K_{Ca3.1}$ -Expression gesteigert, während die fehlende Expression von $K_{Ca2.3}$ hierbei keinen signifikanten Einfluss hatte. Diese Beobachtung könnte auf eine verminderte Compliance in $K_{Ca3.1}^{-/-}$ Tieren hindeuten, die möglicherweise eine Folge des chronisch erhöhten Blutdrucks (aufgrund des lebenslangen Fehlen des Kanals) und damit einhergehender struktureller Veränderungen der Gefäßwand sein könnte. Dies muss nun allerdings in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Insgesamt betrachtet weisen die vorliegenden Ergebnisse einen direkten Zusammenhang zwischen der endothelvermittelten Vasodilatation durch endotheliale K_{Ca} -Kanäle und der Regulation des systemischen Blutdruckes nach. Anscheinend können die durch den Verlust der Kanäle erzeugten Defekte der Gefäßtonusregulation und die Blutdruckveränderungen durch die weiteren zahlreichen Blutdruckregulationsmechanismen nicht ausreichend kompensiert werden. Dies spricht für die herausragende Bedeutung des EDHF-Systems bei der systemischen Blutdruckregulation.

Interessant war auch der Befund, dass ein höherer Blutdruck bei den K_{Ca} -defizienten Tieren nur während der Aktivitätsphasen beobachtet werden konnte. Dies könnte ein Hinweis auf eine wichtige Rolle des EDHF -Systems bei der Feinjustierung des Blutdrucks bei physischer Aktivität sein. Auch eine gegenregulatorische Funktion bei Sympathikusaktivität ist vorstellbar. Weitere Untersuchungen müssen hier jedoch Aufschluss geben.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse aus den Blutdruckmessungen für die besondere Bedeutung der K_{Ca} -Kanäle und der durch sie initiierten EDHF-vermittelten Vasodilatation als wichtiger Bestandteil der Kreislauf- und Blutdruckregulation.

4.7 EDHF-ABHÄNGIGE VASODILATATION BEIM MENSCHEN

Bei Untersuchungen von physiologischen Mechanismen anhand von Tiermodellen muss die kritische Frage nach der Anwendbarkeit auf die menschliche Physiologie und damit nach der medizinischen Relevanz der Ergebnisse gestellt werden. Beim Menschen konnten L-NNA- und indomethazinresistente endothelvermittelte Vasodilatationen, also

EDHF-Antworten, in Gefäßpräparaten der Arteria thoracica interna, A. renalis, A. radialis sowie zerebralen und koronaren Arterien nachgewiesen werden. Neben dem Vorkommen in diesen großen Gefäßen wurde ebenfalls eine EDHF-medierte Vasodilatation in Widerstandsgefäßen beschrieben (Feletou, Vanhoutte 2007). Auch zeigen in vivo- Untersuchungen mit lokaler Infusion von L-NNA und TEA (Tetraethylammonium) an Unterarmarterien von Probanden, dass eine Beteiligung von K_{Ca} -Kanälen an der Gefäßtonusregulation dieser Gefäße wahrscheinlich ist (Bellien, Iacob et al. 2006). Andere Studien diskutieren auch die Beteiligung von Cytochrom-P450-abhängigen Faktoren (Hillig, Krstrup et al. 2003). Außerdem konnte beobachtet werden, dass auch beim Menschen die Bedeutung des EDHF für die Vasodilatation mit abnehmendem Gefäßdurchmesser steigt, was den Beobachtungen aus den Tiermodellen entspricht (Woolfson, Benjamin et al. 1991; Urakami-Harasawa, Shimokawa et al. 1997). Aussagen zum Einfluss des EDHF auf den arteriellen Blutdruck beim Menschen können allerdings noch nicht gemacht werden, da bislang keine klinischen Untersuchungen mit selektiven K_{Ca} -Modulatoren vorliegen.

Insgesamt lässt die bisherige Datenlage jedoch den Schluss zu, dass beim Menschen wie auch im Tiermodell der EDHF-Komplex eine wichtige Komponente der endothelialen und vaskulären Funktion darstellt, was für die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tiermodellen und für die medizinische Bedeutung von Grundlagenforschung zu diesem Thema spricht.

4.8 ENDOTHELIALE DYSFUNKTION UND THERAPEUTISCHE PERSPEKTIVEN

Ein intaktes Endothel ist von essenzieller Bedeutung für das kardiovaskuläre System des Menschen. Bei zahlreichen Erkrankungen spielen sich zentrale pathophysiologische Prozesse am Endothel ab. Dazu gehören Erkrankungen wie die koronare Herzkrankheit und der Schlaganfall, die für einen Großteil der Morbidität und Mortalität in westlichen Industrienationen verantwortlich sind. Ebenso kommt es im Rahmen zahlreicher chronischer Erkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus oder Hyperlipidämien auch zu einer endothelialen Dysfunktion. Davon ist auch die Regulation des Gefäßtonus betroffen. Viele Studien legen nahe, dass speziell das NO-System von einer verminderten NO-Bildung oder Bioverfügbarkeit betroffen ist (Endemann, Schiffrin 2004). Hierbei könnte eine erhöhte Produktion von freien Sauerstoffradikalen (oxidativer Stress) zur einer schnellen Inaktivierung von NO führen und somit endotheliale Vasodilatationsmechanismen stören.

In diesem Zusammenhang konnte aber interessanterweise auch nachgewiesen werden, dass reaktive Sauerstoffspezies nicht nur die Funktion von NO erheblich beeinträchtigen, sondern auch die Aktivität von K_{Ca} -Kanälen und damit die EDHF-vermittelte Vasodilatation negativ beeinflussen (Zou, Ullrich, et al. 2004, Munzel, Daiber et al. 2005, Kusama, Kajiguri et al. 2005).

Dem EDHF-System werden aber auch kompensatorische Funktionen zugeschrieben. So konnten tierexperimentelle Studien zeigen, dass die Reduktion der NO-Synthese bei endothelialer Schädigung durch die EDHF- Vasodilatation kompensiert werden kann. Zum Beispiel beobachteten Najibi et al. eine erhaltene endothelvermittelte Dilatation trotz einer signifikant reduzierten NO-Antwort in der Arteria carotis communis von Hasen mit Hypercholesterinämie (Najibi, Cowan et al. 1994). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass es durch chronisch erhöhten Blutdruck in der Mikrozirkulation von hypertensiven Ratten zu einer Aktivitätserhöhung von Kaliumkanälen kommt (Liu, Hudetz et al. 1998; Asano, Masuzawa-Ito et al. 1993), möglicherweise um den möglichen Verlust der NO-Aktivität in diesen Gefäßen zu kompensieren.

Störungen des EDHF-Systems wurden sowohl bei Experimenten an diabetischen Ratten als auch beim Diabetes des Menschen beobachtet (De Vriese, Van de Voorde et al. 2000; Fitzgerald, Kemp-Harper et al. 2005). Diabetes scheint die EDHF-Funktion insbesondere in kleineren Arterien zu beeinträchtigen, so konnten zum Beispiel reduzierte EDHF-vermittelte Vasodilatationen in menschlichen Widerstandsgefäßen des Penis von diabetischen Patienten nachgewiesen werden (Angulo, Cuevas et al., 2003).

Aktuelle Hinweise für eine wichtige Funktion von $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ bei der Gefäßtonusregulation zerebraler Gefäße liefern Cipolla et al. (Cipolla, Smith et al. 2009): Bei Ratten konnten die Autoren nachweisen, dass die NO-vermittelte Vasodilatation an parenchymalen Arterien nach Ischämie und Reperfusion deutlich reduziert war, und die endothelvermittelte Vasodilatation nach einem solchen ischämischen Ereignis vor allem durch die Aktivität von $K_{Ca2.3}$ und $K_{Ca3.1}$ aufrecht erhalten wurde.

In den Experimenten zu dieser Dissertation konnte durch die erstmalige Erzeugung eines genetischen $K_{Ca3.1}/K_{Ca2.3}$ - Knockoutmodells die essenzielle Rolle der beiden Kaliumkanäle für die endothelvermittelte Vasodilatation durch EDHF und den systemischen Blutdruck nachgewiesen werden. Die Reihe von pathophysiologischen Prozessen, bei denen EDHF eine wichtige Rolle zu spielen scheint, machen diese beiden

Ionenkanäle nun zu interessanten neuen therapeutischen Zielstrukturen zur Behandlung des Bluthochdrucks oder bei endothelialen Dysfunktionen.

Dies ist prinzipiell möglich, wie Experimente mit dem neuartigen, sehr selektiven K_{Ca} 3.1-Öffner SKA-31 (Naphtho[1,2-*d*]thiazol-2-ylamin) aus unserer eigenen Arbeitsgruppe in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heike Wulff (University of California, Davis, USA) zeigen (Brähler, Kaistha et. al. 2009; Sankaranarayanan, Raman et al., 2008) Hier konnte SKA-31 nicht nur die EDHF-vermittelte Vasodilatation verstärken, sondern erwies sich auch als blutdrucksenkend. Diese ersten Experimente deuten also daraufhin, dass endotheliale K_{Ca} -Aktivatoren möglicherweise von therapeutischen Nutzen zur endothelspezifischen Behandlung einer Hypertonie sein könnten.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Adelman, J., K. Shen, et al. (1992). "Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs." Neuron **9**(2): 209-16.
- Angulo, J., P. Cuevas, et al. (2003). "Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF." Biochem Biophys Res Commun **312**: 1202–1208.
- Asano, M., K. Masuzawa-Ito, et al. (1993). "Functional role of Ca(2+)-activated K⁺ channels in resting state of carotid arteries from SHR." Am J Physiol **265**: 843-51.
- Atkinson, N., G. Robertson, et al. (1991). "A component of calcium-activated potassium channels encoded by the Drosophila slo locus." Science **253**(5019): 551-5.
- Barrett, J., K. Magleby, et al. (1982). "Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle." J Physiol **331**: 211-230.
- Bellien, J., M. Iacob, et al. (2006). "Crucial role of NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor in human sustained conduit artery flow-mediated dilatation." Hypertension **48**(6): 1088-94.
- Bond, C.T., R. Sprengel, et al. (2000). "Respiration and parturition affected by conditional overexpression of the Ca²⁺-activated K⁺ channel subunit, SK3." Science **289**(5486): 1942-6.
- Brähler S., A. Kaistha, et al. (2009) "Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension." Circulation **119**(17):2323-32.
- Bredt, D.S., S.H. Snyder (1990). "Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(2): 682-5.
- Brenner, R., G. Perez, et al. (2000). "Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel." Nature **407**: 870-876.
- Burgess, G., M. Claret, et al. (1981). "Effects of quinine and apamin on the calcium-dependent potassium permeability of mammalian hepatocytes and red cells." J Physiol **317**: 67-90.
- Burnham, M., R. Bychkov, et al. (2002). "Characterization of an apamin-sensitive small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF." Br J Pharmacol **135**(5): 1133-1143.
- Busse, R., G. Edwards, et al. (2002). "EDHF: bringing the concepts together." Trends Pharmacol Sci **23**(8): 374-80.

- Bychkov, R., M. P. Burnham, et al. (2002). "Characterization of a charybdotoxin-sensitive intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel in porcine coronary endothelium: relevance to EDHF." Br J Pharmacol **137**(8): 1346-54.
- Campbell, W., D. Gebremedhin, et al. (1996). "Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors." Circ Res **78**(3): 414-23.
- Carvajal, J., A. Germain, et al. (2000). "Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation." J Cell Physiol. **184**(3): 409-20.
- Chen, G., H. Suzuki, et al. (1988). "Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels." Br J Pharmacol **95**: 1165-1174.
- Chen, G., D. Cheung (1992). "Calcium activation of hyperpolarization response to acetylcholine in coronary endothelial cells." J Cardiovasc Pharmacol **12**: S119-S123.
- Cipolla, M.J., J. Smith, et al. (2009). "SKCa and IKCa Channels, myogenic tone, and vasodilator responses in middle cerebral arteries and parenchymal arterioles: effect of ischemia and reperfusion." Stroke **40**(4):1451-7.
- Cohen, R., F. Plane, et al. (1997). "Nitric oxide is the mediator of both endothelium-dependent relaxation and hyperpolarisation of the rabbit carotid artery." Proc Natl Acad Sci USA. **94**: 4193-8.
- Cox, D., J. Cui, et al. (1997). "Allosteric gating of a large conductance Ca -activated K^{+} channel." J Gen Physiol **110**: 257-281.
- de Wit, C., C. Schafer, et al. (1997). "Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation in vivo." Pflugers Arch **434**(4): 354-61.
- de Wit, C., F. Roos, et al. (2000). "Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice." Circ Res **86**(6): 649-55.
- de Wit, C., F. Roos, et al. (2003). "Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion." Physiol Genomics **13**(2): 169-77.
- De Vriese, A.S., J. Van de Voorde, et al. (2000). "The impaired renal vasodilator response attributed to endothelium-derived hyperpolarizing factor in streptozotocin – induced diabetic rats is restored by 5-methyltetrahydrofolate." Diabetologia **43**: 1116–1125.
- del Valle-Rodriguez, A., J. Lopez-Barneo, et al. (2003). " Ca^{2+} channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca^{2+} influx." EMBO J. **22**(17): 4337-45.

- Dolor, H., L. Hurwitz, et al. (1992). "Regulation of extracellular calcium entry in endothelial cells: role of intracellular calcium pool." Am J Physiol Cell Physiol **262**: C171-C181.
- Dora, K. A., N. T. Gallagher, et al. (2008). "Modulation of endothelial cell KCa3.1 channels during endothelium-derived hyperpolarizing factor signaling in mesenteric resistance arteries." Circ Res **102**(10): 1247-55.
- Doyle, D., J. Cabral, et al. (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K conduction and selectivity." Science **280**: 69-77.
- Dror, V., E. Shamir, et al. (1999). "hKCa3/KCNN3 potassium channel gene: association of longer CAG repeats with schizophrenia in Israeli Ashkenazi Jews, expression in human tissues and localization to chromosome 1q21." Mol Psychiatry **4**: 254-60.
- Edwards, G., K.A. Dora, et al. (1998). "K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries." Nature **396**(6708): 269-72.
- Edwards, G., M. Feletou, et al. (1999). "Role of gap-junctions in the responses to EDHF in rat and guinea pig arteries." Br J Pharmacol. **128**: 1788-1794.
- Eichler, I., J. Wibawa, et al. (2003). "Selective blockade of endothelial Ca²⁺-activated small- and intermediate-conductance K⁺-channels suppresses EDHF-mediated vasodilation." Br J Pharmacol **138**(4): 594-601.
- Endemann, D.H., E.L. Schiffrin (2004). "Endothelial dysfunction." J Am Soc Nephrol. **15**(8):1983-92
- Fabiato, A., Fabiato, F. (1979). "Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals und ligands used for experiments in skinned muscle cells." J Physiol (Paris) **75**(5): 463-505.
- Fanger, C.M., S. Ghanshani, et al. (1999). "Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1." J Biol Chem **274**(9): 5746-54.
- Feletou, M., P. Vanhoutte (1988). "Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle." Br J Pharmacol. **93**(3): 515-524.
- Feletou, M., P. Vanhoutte (2006). "Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(6): 1215-25.
- Feletou, M., P. Vanhoutte (2007). "Endothelium-dependent hyperpolarizations: Past beliefs and present facts." Ann Med **39**: 495-516.
- Fisslthaler, B., R. Popp, et al. (1999). "Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries." Nature **401**(6752): 493-7.

- Fitzgerald, S.M., B.K. Kemp-Harper, et al. (2005). „Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in endothelial dysfunction during diabetes.” Clin Exp Pharmacol Physiol **32**: 482–487.
- Fleming, I., R. Busse (2006). "Endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids and vascular function." Hypertension **47**(4): 629-33.
- Fransen, P., M. Demolder, et al. (1995). "Whole cell membrane currents in cultured pig and endocardial endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol. **268**: H2036-H2047.
- Fukao, M., Y. Hattori, et al. (1995). "Thapsigargin- and cyclopiazonic acid-induced endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery." Br J Pharmacol. **115**(6): 987-92.
- Furchgott, R., J.V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-6.
- Galvez, A., G. Gimenez-Gallego, et al. (1990). "Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*." J Biol Chem **265**: 11083-11090.
- Gardos, G. (1958). "The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes." Biochim Biophys Acta **30**(3): 653-4.
- Gauthier, K., C. Deeter, et al. (2002). "14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic hyperpolarization and relaxation in coronary arteries." Circ Res. **90**(9): 1028-1036.
- Ghanshani, S., H. Wulff, et al. (2000). "Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences." J Biol Chem. **275**(47): 37137-49.
- Grgic, I., I. Eichler, et al. (2005). "Selective blockade of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(4): 704-9.
- Grgic, I., Kaistha, B.P., et al. (2009) "Endothelial Ca⁺⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses-relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery." Br J Pharmacol. **157**(4):509-26.
- Gribkoff, V., J. Starrett, et al. (1997). "The pharmacology and molecular biology of large-conductance calcium-activated (BK) potassium channels." Adv Pharmacol **37**: 319-348.
- Griffith, T. M. (2004). "Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis?" Br J Pharmacol **141**(6): 881-903.

- Gutman, G. A., K. Chandy, et al. (2003). "International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels." *Pharmacol Rev.* **55**(4): 583-6.
- Hamill, O.P., A. Marty et al. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch.* **391**(2):85-100.
- Hartmannsgruber, V., W.T. Heyken, et al. (2007). "Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression." *PLoS ONE* **2**(9): e827.
- Hille, B., C. Armstrong, et al. (1999). "Ion channels: from idea to reality." *Nat Med* **5**(10): 1105-9.
- Hillig, T., P. Krstrup, et al. (2003). "Cytochrome P450 2C9 plays an important role in the regulation of exercise-induced skeletal muscle blood flow and oxygen uptake in humans." *J Physiol* **546**: 307-14.
- Horrigan, F., J. Cui, et al. (1999). "Allosteric voltage gating of potassium channels. I. Mslo ionic currents in the absence of Ca(2+)." *J GenPhysiol* **114**: 277-304.
- Huang, A., D. Sun, et al. (2005). "Epoxyeicosatrienoic acids are released to mediate shear-stress-dependent hyperpolarisation of arteriolar smooth muscle." *Circ Res.* **96**(3): 376-383.
- Ignarro, L., R. Byrns, et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical." *Circ Res.* **61**(6): 866-879.
- Ishii, T. M., C. Silvia, et al. (1997). "A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11651-6.
- Itoh, T., N. Seki, et al. (1992). "Membrane hyperpolarisation inhibits agonist-induced synthesis of inositol 1,4,5-trisphosphate in rabbit mesenteric artery." *J Physiol* **451**: 307-28.
- Joannides, R., W.E. Haefeli, et al. (1995). "Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo." *Circulation* **91**(5): 1314-9.
- Johns A., A.D. Freay, D.J. Adams, et al. (1988). "Role of calcium in the activation of endothelial cells." *J Cardiovasc Pharmacol* **12**: 119-123.
- Joiner, W., R. Khanna, et al. (2001). "Calmodulin Regulates Assembly and Trafficking of SK4/IK1 Ca²⁺-activated K⁺ Channels." *J Biol Chem* **276**(41): 37980–37985.
- Joiner, W., L. Wang, et al. (1997). "hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels." *Proc. Natl Acad. Sci.USA* **94**: 11013-11018.

- Knaus, H., A. Eberhart, et al. (1994). "Pharmacology and structure of high conductance calcium-activated potassium channels." Cell Signal **6**: 861-870.
- Koeppen, M., R. Feil, et al. (2004). "cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels in vivo." Hypertension **44**(6): 952-5.
- Köhler, M., B. Hirschberg, et al. (1996). "Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain." Science **273**(5282): 1709-14.
- Köhler, R., C. Degenhardt, et al. (2000). "Expression and function of endothelial Ca(2+)-activated K(+) channels in human mesenteric artery: A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ." Circ Res **87**(6): 496-503.
- Köhler, R., S. Brakemeier, et al. (2001). "Impaired hyperpolarization in regenerated endothelium after balloon catheter injury." Circ Res **89**(2): 174-9.
- Köhler, R., H. Wulff, et al. (2003). "Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis." Circulation **108**(9): 1119-25.
- Köhler, R., J. Hoyer (2007). "The endothelium-derived hyperpolarizing factor: insights from genetic animal models." Kidney Int **72**(2): 145-50.
- Kusama, N., J. Kajiguri, et al. (2005). "Reduced hyperpolarization in endothelial cells of rabbit aortic valve following chronic nitroglycerine administration." Br J Pharmacol. **146**: 487-497.
- Lacy, P., G. Pilkington, et al. (2000). "Evidence against potassium as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric small arteries." Br J Pharmacol. **129**: 605-611.
- Laurent S, Boutouyrie P. (2007). "Recent advances in arterial stiffness and wave reflection in human hypertension." Hypertension **49**:1202-1206.
- Ledoux, J., M.S. Taylor, et al. (2008). "Functional architecture of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in restricted spaces of myoendothelial projections." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(28): 9627-32.
- Ledoux, J., M. Werner, et al. (2006). "Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone." Physiology (Bethesda) **21**: 69-78.
- Litt, M., D. LaMorticella, et al. (1999). "Gene structure and chromosome mapping of the human small-conductance calcium-activated potassium channel SK1 gene (KCNN1)." Cytogenet Cell Genet **86**: 70-3.

- Liu, Y., A. Hudetz, et al. (1998). "Increased expression of Ca^{2+} -sensitive K^{+} channels in the cerebral microcirculation of genetically hypertensive rats: evidence for their protection against cerebral vasospasm." Circ Res. **82**(6): 729-37.
- Logsdon, N. J., J. Kang, et al. (1997). "A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes." J Biol Chem **272**(52): 32723-6.
- McNeish, A.J., S.L. Sandow, et al. (2006). "Evidence for involvement of both IKCa and SKCa channels in hyperpolarizing responses of the rat middle cerebral artery." Stroke **37**(5): 1277-82.
- Moncada S., R.M. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacol Rev. **43**(2): 109-42.
- Moncada S., R.M. Palmer, E. Higgs (1989). "Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. " Biochem Pharmacol **38**(11): 1709-15.
- Moncada S., J.R. Vane. (1978). "Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin." Pharmacol Rev **30**(3): 293-331.
- Moncada S., J.R. Vane (1981). "Prostacyclin: its biosynthesis, actions and clinical potential." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. **294**(1072): 305-29.
- Munzel, T., A. Daiber, et al. (2005). "Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**: 1551-1557.
- Murray, K. (1990). "Cyclic AMP and mechanisms of vasodilation." Pharmacol Ther **47**(3): 329-45.
- Najibi, S., C. Cowan, et al. (1994). "Enhanced role of potassium channels in relaxations to acetylcholine in hypercholesterolemic rabbit carotid artery." Am J Physiol **266**: 2061-7.
- Neher, E., B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**: 799-802.
- Nelson, M., J. Quayle (1995). "Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle." Am J Physiol. **268**: C799-822.
- Neylon, C., R. Lang, et al. (1999). "Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel in vascular smooth muscle: relationship between K(Ca) channel diversity and smooth muscle function." Circ Res. **85**: 33-43.

- Nilius, B., G. Droogmans (2001). "Ion channels and their functional role in vascular endothelium." Physiol Rev **81**(4): 1415-59.
- Numberger, M., A. Draguhn (1996). Patch-Clamp-Technik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Olesen, S., E. Munch, et al. (1994). "Selective activation of Ca(2+)-dependent K⁺ channels by novel benzimidazolone." Eur J Pharmacol **251**: 53-59.
- Pedersen, S., G. Owsianik, et al. (2005). "TRP channels: an overview." Cell Calcium. **38**(3-4): 233-52.
- Pena, T.L., S.G. Rane (1999). "The fibroblast intermediate conductance K(Ca) channel, FIK, as a prototype for the cell growth regulatory function of the IK channel family." J Membr Biol **172**(3): 249-57.
- Pohl, U., J. Holtz, et al. (1986). "Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo." Hypertension **8**(1): 37-44.
- Popp, R., I. Fleming, R. Busse (1998). "Pulsatile stretch in coronary arteries elicits release of endothelium-derived hyperpolarizing factor: a modulator of arterial compliance." Circ Res **82**:696-703.
- Prior, H.M., N. Webster, et al. (1998). "K(+)-induced dilation of small renal artery: no role for inward rectifier K(+)-channels." Cardiovasc Res. **37**: 780-790.
- Rapoport, R., M. Draznin, et al. (1983). "Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation." Nature **306**(5939): 174-6.
- Rees D., Palmer R.M., et al. (1990). "Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo." Br J Pharmacol. **101**(3): 746-52.
- Richard, V., F. Tanner, et al. (1990). "Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin, and clonidine in coronary arteries." Am J Physiol. **259**: H1433-9.
- Rosa, J., D. Galanakis, et al. (1998). "Bis-Quinolinium Cyclophanes:6,10-Diaza-3(1,3),8(1,4)-dibenzena-1,5(1,4)-diquinolinacyclodecaphane (UCL 1684), the First Nanomolar, Non-Peptidic Blocker of the Apamin-Sensitive Ca-Activated K⁺ Channel." J. Med. Chem. **41**: 2-5.
- Roux, B. (2005). "Ion conduction and selectivity in K(+) channels." Annu Rev Biophys Biomol Struct **34**: 153-71.
- Saliez, J., C. Bouzin et al. (2008). "Role of caveolar compartmentation in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca²⁺ signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells." Circulation. **117**(8):1065-74

- Sandow S.L., C.E. Hill (2000). "Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor mediated-responses." Circ Res **86**: 341-346.
- Sankaranarayanan, A., G. Raman, et al. (2009). "Naphtho[1,2-d]thiazol-2-ylamine (SKA-31), a new activator of K_{Ca}2 and K_{Ca}3.1 potassium channels, potentiates the endothelium-derived hyperpolarizing factor response and lowers blood pressure." Mol Pharmacol **75**(2):281-95.
- Schilling, W., O. Cabello, et al. (1992). "Depletion of the 1,4,5-trisphosphate-sensitive intracellular Ca²⁺ store in vascular endothelial cells activates the agonist-sensitive Ca²⁺-influx pathway." Biochem J. **284**: 521-530.
- Schreiber, M., L. Salkoff (1997). "A novel calcium-sensing domain in the BK channel." Biophys J **73**: 1355–1363.
- Schubert, R., M. Nelson (2001). "Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle." Trends Pharmacol Sci **22**(10): 505-512.
- Schumacher, M., M. Crum, et al. (2004). "Crystal structures of apocalmodulin and an apocalmodulin/SK potassium channel gating domain complex." Structure (Camb) **12**: 849-860.
- Schumacher, M., A. Rivard, et al. (2001). "Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin." Nature **410**: 1120-1124.
- Shimokawa, H., H. Yasutake, et al. (1996). "The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation." J Cardiovasc Pharmacol **28**(5): 703-11.
- Shmukler, B., C.T. Bond, et al. (2001). "Structure and complex transcription pattern of the mouse SK1 K(Ca) channel gene, KCNN1." Biochim. Biophys. Acta **1518**: 36-46.
- Si, H., W. T. Heyken, et al. (2006). "Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel." Circ Res **99**(5): 537-44.
- Singh, S., C. Syme, et al. (2001). "Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease." J Pharmacol Exp Ther. **296**(2): 600-11.
- Smith W.L. (1992). " Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action." Am J Physiol. **263**: F181-91.

- Soh, H., C. Park (2001). "Inwardly rectifying current-voltage relationship of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels rendered by intracellular divalent cation blockade." Biophys. J. **80**: 2207-2215.
- Stocker, M. (2004). " Ca^{2+} -Activated K^{+} Channels: Molecular determinants and function of the SK family." Nature **5**:758-770.
- Stocker, M., P. Pedarzani (2000). "Differential distribution of three $\text{Ca}(2+)$ -activated $\text{K}(+)$ channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system." Mol Cell Neurosci **15**(5): 476-93.
- Syme, C., A. Gerlach, et al. (2000). "Pharmacological activation of cloned intermediate- and small-conductance $\text{Ca}(2+)$ -activated $\text{K}(+)$ channels." Am J Physiol Cell Physiol. **278**(3): 570-81.
- Tacconi, S., R. Carletti, et al. (2001). "Distribution of the messenger RNA for the small conductance calcium-activated potassium channel SK3 in the adult rat brain and correlation with immunoreactivity." Neuroscience **102**: 209-15.
- Talukder, G., R. Aldrich (2000). "Complex voltage-dependent behavior of single unliganded calcium-sensitive potassium channels." Biophys J **78**: 761-772.
- Tanaka, Y., P. Meera, et al. (1997). "Molecular constituents of maxi KCa channels in human coronary smooth muscle: predominant $\alpha + \beta$ subunit complexes." J Physiol **502**: 545-557.
- Taylor, H., A. Chaytor, et al. (1998). "Inhibition of the gap junctional component of endothelium-dependent relaxation in rabbit iliac artery by 18 α -glycyrrhetic acid." Br J Pharmacol. **125**: 1-4.
- Taylor, M.S., A.D. Bonev, et al. (2003). "Altered expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure." Circ Res **93**(2): 124-31.
- Tomita, H., V.G. Shakkotai et al. (2003). "Novel truncated isoform of SK3 potassium channel is a potent dominant-negative regulator of SK currents: implications in schizophrenia." Mol. Psychiatry **8**:524-535.
- Tseng-Crank, J., N. Godinot, et al. (1996). "Cloning, expression, and distribution of a $\text{Ca}(2+)$ -activated K^{+} channel β -subunit from human brain." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(17): 9200-5.
- Urakami-Harasawa, L., H. Shimokawa, et al. (1997). "Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries." J Clin Invest **100**(11): 2793-9.
- Vaca, L., D. Kunze (1995). " IP_3 -activated Ca^{2+} channels in the plasma membrane of cultured vascular endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **269**: c733-c738.

- Vazquez, E., Nobles M., et al. (2001). "Defective regulatory volume decrease in human cystic fibrosis tracheal cells because of altered regulation of intermediate conductance Ca^{2+} -dependent potassium channels." Proc Natl Acad Sci U S A. **2001** **98**(9): 5329-34.
- Vergara, C., R. Latorre, et al. (1998). "Calcium-activated potassium channels." Curr Opin Neurobiol. **8**(3):321-9.
- Voets, T., G. Droogmans, et al. (1996). "Ionic currents in non-stimulated endothelial cells from bovine pulmonary artery." J Physiol **497**: 95-107.
- Weston, A. H., M. Absi, et al. (2005). "Evidence in favor of a calcium-sensing receptor in arterial endothelial cells: studies with calindol and Calhex 231." Circ Res **97**(4): 391-8.
- Woolfson, R., N. Benjamin, et al. (1991). "Ouabain and responses to endothelium-dependent vasodilators in the human forearm." Br J Clin Pharmacol. **32**: 758-60.
- Wulff, H., G. Gutman, et al. (2001). "Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1 ." J Biol Chem **276**(34): 32040-5.
- Wulff, H., M. J. Miller, et al. (2000). "Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel, IKCa1 : a potential immunosuppressant." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8151-6.
- Xia, X., B. Fakler, et al. (1998). "Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels." Nature **395**: 503-507.
- Yeh, H., S. Rothery, et al. (1998). "Individual gap junction plaques contain multiple connexins in arterial endothelium." Circ Res. **83**(12): 1248-1263.
- Yellen, G. (2002). "The voltage-gated potassium channels and their relatives." Nature **419**(6902): 35-42.
- Zou M.H., V. Ullrich, et al. (2004). "Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus." Endothelium **11**: 89-97.

6 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren

an der Philipps-Universität Marburg:

Aumüller
Barth
Bartsch
Basler
Baum
Busch
Cetin
Christiansen
Czubayko
Daut
Engenhard-Cabillic
Feuser
Freitag
Fuchs - Winkelmann
Giebing
Gress
Grundmann
Gudermann
Grzeschik
Hadji
Hasilik
Hegele
Hermann-Lingen
Hertl
Hilt
Höffken
Hofmann
Hoffmann
Hoyer
Kalinowski
Kiriazidis
Klose
Köhler
Koolman
Krieg
Kroll
Kuhlmann
Lang
Langer
Lill
Lohoff
Maier
Maisch
Maschuw
Mederos y Schnitzler

Mennel
Moll
Moosdorf
Müller
Mueller
Mutters
Neubauer
Oertel
Pagenstecher
Plant
Renz
Ramaswamy
Riße
Ritter
Röhm
Röper
Rothmund
Ruchholtz
Schäfer
Schneider
Sesterhenn
Skrzypek
Steiniger
Sundermeyer
Tackenberg
Topp
Voigt
Vogelmaier
Wagner
Weihe
Werner
Wulff
Zettl

an der University of Newcastle-upon-Tyne, Großbritannien (Praktisches Jahr):

Atkins
Ellis
Hadi
Pate
Price
Schmid
Schwab

an der Universität Bern, Schweiz (Praktisches Jahr):

Bicker
Frigerio
Galimanis
Hess
Mattle
Sturzenegger

7 DANKSAGUNG:

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Joachim Hoyer möchte ich mich herzlich für das Anvertrauen dieses sehr interessanten Themas und die exzellente Unterstützung dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. Ralf Köhler für sein ausgezeichnetes Engagement und die hervorragende Betreuung bei der Planung und Durchführung dieses Projektes.

Herrn Dr. rer. nat. Willm-Thomas Heyken und Herrn Dr. rer. nat. Han Si danke ich für die Einführung in laborexperimentelle Techniken und das Beantworten zahlloser Fragen. An Herrn Dr. med. Christoph Busch geht der Dank für die Operation der Versuchstiere zur Blutdruckmessung und an Frau M.Sc. Anuradha Kaistha für die gute Zusammenarbeit.

Allen anderen Mitarbeitern und Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe möchte ich für die sehr kollegiale, freundschaftliche und motivierende Zusammenarbeit im Labor danken. Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin Martina für den großen Rückhalt und die Unterstützung in allen Lebenslagen.